

Toxicologie
Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques

3e édition

Pharmacie - Biologie :
- Concours de l'Internat
- Formation continue

Collection dirigée par
Michel VAUBOURDOLLE



Tome 1

Toxicologie
Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques

3e édition

Collection dirigée par
Michel VAUBOURDOLLE

COLLECTION
LE MONITEUR
INTERNAT



1, rue Eugène et Armand Peugeot
92856 Rueil-Malmaison cedex
ISBN : 978-2-915585-38-4

Comité éditorial

Avant-propos

Le Moniteur Internat est devenu pour les étudiants en Pharmacie qui souhaitent passer le Concours de l'Internat en Pharmacie un outil de référence comportant les connaissances essentielles, accompagnées d'applications pratiques. C'est également pour les pharmaciens et les biologistes une base de formation continue rassemblant l'essentiel des disciplines pharmaceutiques.

Pour continuer la double action qui actualise l'ensemble des disciplines de la biologie et de la pharmacie et qui permet aux étudiants de disposer d'un outil performant, nous avons rassemblé l'ensemble des questions figurant au programme de l'Internat en Pharmacie dans quatre volumes.
Ces ouvrages constituent la troisième édition de la collection du Moniteur Internat. La rubrique « Vérifiez vos connaissances », qui comprend notamment des QCM et des cas cliniques, a été actualisée, enrichie et sera prochainement disponible en ligne sur www.WK-pharma.fr.

Le premier tome, « Toxicologie, Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques », regroupe l'essentiel des questions fondamentales ou analytiques ainsi que la Toxicologie.
Le deuxième tome, centré sur la Biologie, comporte la Biochimie et l'Hématologie.
La Biologie et la Pharmacie se retrouvent dans le troisième tome, consacré à l'Infectiologie : celui-ci rassemble les questions d'Immunologie, de Bactériologie, de Virologie, de Mycologie, de Parasitologie, d'Hygiène et de Prévention ainsi que les médicaments associés.
Enfin, le quatrième et dernier tome est ciblé sur le Médicament au sens le plus général : Physiologie, Pharmacologie, Pharmacie Clinique.

Dr Michel VAUBOURDOLLE
Biologiste des Hôpitaux
Directeur de Collection

Sommaire

Toxicologie générale

Toxicologie clinique

Statistiques

Toxicologie générale

Méthodes d'évaluation de la toxicité du médicament

E. BOICHOT, Inserm U456, faculté de Pharmacie, université de Rennes I.
J.-P. ANGER, Laboratoire de toxicologie, faculté de Pharmacie, Rennes.

La mise sur le marché d'un médicament est subordonnée à une autorisation après examen d'un dossier très complet comportant d'une part, les résultats des essais analytiques, toxicologiques, pharmacologiques et cliniques de la future spécialité pharmaceutique et d'autre part, les dossiers élaborés par des experts qui se prononcent sur la qualité scientifique du dossier.
L'autorisation de mise sur le marché ou AMM est délivrée si le médicament remplit les conditions requises d'efficacité et de tolérance, et si les contrôles de fabrication confirment la qualité du produit.
Deux étapes, en dehors du dossier analytique, doivent donc être franchies avant la première utilisation d'un médicament :
- *l'une concerne sa sécurité (dossier toxicologique) ;*
- *l'autre, son efficacité (dossiers pharmacologique et clinique).*

En 1995, un nouveau système d'autorisation des médicaments a été mis en place dont la base juridique est formée par 3 directives et 1 règlement, adoptés en juin 1993 par le conseil de la communauté européenne. Ainsi, 2 procédures pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché coexistent :
- *Une procédure dite centralisée qui est obligatoire pour les produits de haute technologie et optionnelle pour les médicaments innovants. Les dossiers sont alors soumis à l'Agence européenne pour l'évaluation des médicaments (European agency for the evaluation of medicinal products, EMEA). L'autorisation obtenue dans ce cas-là est unique et valable pour l'ensemble de la communauté européenne ;*
- *Une procédure décentralisée s'applique à la majorité des produits conventionnels et fonctionne sur le principe de la reconnaissance mutuelle des autorisations nationales. Elle permet l'extension d'une AMM octroyée par un État membre à un ou plusieurs autres États membres choisis par le demandeur.*

Dans les deux cas, la décision finale est adoptée par l'EMEA.

I. Les bonnes pratiques de laboratoire

Les États membres veillent par ailleurs à ce que les essais de sécurité soient exécutés en conformité avec les dispositions relatives aux principes des bonnes pratiques de laboratoire (BPL).
L'évaluation des dangers liés à l'utilisation d'un médicament doit être fondée sur des données dont la qualité est assurée. Le concept des bonnes pratiques de laboratoire a été établi dans le but de promouvoir la qualité et la validité des données des essais et d'assurer ainsi la sécurité des produits vis-à-vis de la santé humaine et de l'environnement.
En France, deux textes ont été élaborés en 1983 et en 1984 par le ministère des Affaires sociales et de la Solidarité nationale afin de « s'assurer de la qualité des études de toxicologie expérimentale qui doivent être présentées aux autorités compétentes pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché ».
Ces textes exposent, d'une part, les recommandations liées à la mise en place des BPL pour l'exécution d'une étude de toxicologie expérimentale et d'autre part, la conduite à tenir pour effectuer une inspection dans ce domaine. Ils tiennent large-

ment compte des principes relatifs aux BPL que l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a élaborés, permettant ainsi de garantir une reconnaissance par la communauté internationale.
Les BPL constituent donc une démarche qualité dont la clé de voûte est la mise en place dans chaque laboratoire de toxicologie expérimentale d'un « service assurance qualité ». Ce service a pour charge de définir un « programme d'assurance qualité » basé d'une part sur la rédaction de procédures opératoires standardisées qui doivent décrire toutes les opérations usuelles réalisées dans le laboratoire et, d'autre part, sur la mise en place d'un système de contrôle interne. L'organisation en conformité aux BPL permet ainsi de maîtriser toutes les étapes de planification, de réalisation, de contrôle, d'enregistrement et de diffusion d'une étude de toxicologie expérimentale. C'est cette maîtrise et la traçabilité qui en découle (archives des résultats d'essais, des spécimens, des échantillons...) qui assurent la qualité d'un essai.

II. Détermination de la toxicité par administration unique

« La toxicité par administration unique concerne l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et leur apparition, en fonction du temps après administration unique de la substance ou d'une association de substances » (*Journal officiel des communautés européennes* N° L 73/2 du 16 mars 1987).
Cette forme de toxicité, parfois appelée « toxicité aiguë » est en général la première étude réalisée sur une substance lorsque l'on n'a aucune notion ou seulement des notions très théoriques sur sa toxicité.
L'épreuve de toxicité aiguë la plus utilisée implique la détermination de la dose létale médiane (DL 50) du composé, c'est-à-dire « l'expression statistique de la dose de produit qui est supposée tuer 50 % des animaux d'un lot d'expérience » (Gehring, 1973).
La directive 87/176 de la Communauté économique européenne (CEE) indique simplement que ces essais « peuvent fournir des indications sur les effets probables d'un surdosage aigu chez l'homme et peuvent être utiles pour la conception d'études de toxicité par administration répétée chez les espèces animales adéquates. Les informations doivent être données sur le rapport dose/effet. Un degré élevé de précision n'est pas requis ».
Ainsi, selon ces textes, les Européens, sans doute par humanitarisme, ont adopté une attitude plus nuancée et un nouvel état d'esprit face à la DL 50.
Les États-Unis ont désormais une attitude identique à celle de la Communauté économique européenne (CEE) alors que cette donnée demeure indispensable pour les produits administrés une ou plusieurs fois par jour, au Canada et au Japon.
Nous rappellerons brièvement le principe de la détermination de la DL 50 ainsi que les facteurs qui peuvent en modifier le résultat.

A. Principe de la détermination de la DL 50

Le produit à tester (substance active ou association de substances actives, excipients nouveaux) est administré chez au moins deux espèces de mammifères de souche connue, à différentes doses (ou concentrations) à plusieurs groupes d'animaux des deux sexes, à raison d'une dose (ou concentration), par groupe. Dans le cas des rongeurs en général, deux voies d'administration doivent être utilisées et comprendre si possible les voies prévues chez l'homme, l'une d'entre elles au moins devant assurer le passage intégral du médicament inchangé dans le système circulatoire.
Pour la voie pulmonaire, on déterminera une CL 50.
Les animaux sont observés pendant une période de 14 jours suivant l'administration ou plus, si des signes de toxicité sont apparents, par exemple une perte progressive de poids ou une inhibition de la croissance.
On notera :
- les symptômes éventuels d'intoxication ;
- la mortalité s'il y en a ;
- les lésions des principaux organes lors de l'autopsie des animaux morts en cours d'expérimentation ou des survivants sacrifiés à la fin de l'essai. Un examen histopathologique doit être envisagé pour tous les organes révélant des modifications macroscopiques à l'autopsie.

À partir des différents taux de mortalité, la valeur de la DL 50 sera déterminée avec son intervalle de confiance, en précisant la méthode de calcul utilisée. Les méthodes les plus courantes de calcul de la DL 50 sont la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon (1947), le tracé sur papier gausso-logarithmique de Miller et Tainter (1944) et la méthode des moyennes mobiles de Thomson (1947) et Weil (1952).
Dans le cas d'associations de principes actifs, l'étude est effectuée de façon à vérifier s'il y a ou non des phénomènes de potentialisation ou des effets toxiques nouveaux.
En définitive, l'essai de toxicité aiguë permet :
- d'établir une relation entre la dose administrée et l'intensité des effets observés ;
- de calculer la DL 50 ou la CL 50 du produit testé ;
- d'établir une comparaison de la toxicité avec d'autres substances de toxicité connue ;
- de déterminer la nature des effets toxiques aigus ;
- de fournir des indications sur les effets probables d'une exposition massive chez l'homme ;
- d'orienter les essais ultérieurs de toxicité globale.

B. Facteurs de variation de la DL 50

Il est bien établi que la DL 50 est soumise à de multiples facteurs de variation.

1. Facteurs de variation liés à l'animal

Ce sont en particulier :
- l'espèce : la valeur de la DL 50 peut varier de façon considérable d'une espèce animale à une autre. De la même manière, il existe parfois de profondes différences entre souches d'une même espèce ;

- l'âge : la DL 50 peut varier en fonction de l'âge des animaux d'expérience sans pour autant que cette variation aille dans le même sens ;
- le sexe : est quantitativement un facteur moins important bien que des fluctuations parfois considérables aient été rapportées ;
- le poids : doit également être pris en compte, même si son influence exacte reste mal dissociable de celle de l'âge ;
- la pathologie spontanée : c'est une source évidente de fluctuations généralement imprévisibles ;
- l'alimentation : toute modification qualitative ou quantitative peut avoir un retentissement sur la valeur numérique de la DL 50.

2. Facteurs de variation liés aux conditions expérimentales

Ils sont tout aussi évidents :
- la voie d'administration ;
- la nature du véhicule, la concentration de la substance ;
- la vitesse d'injection ;
- la température ambiante ;
- les conditions d'hébergement des animaux ;
- l'éclairage, le stress, etc. ;
- l'heure de la détermination.

Cette multitude de causes de fluctuation de la DL 50 expliquent bien la mauvaise reproductibilité inter et intralaboratoire que l'on reproche souvent aux études de toxicité aiguë. Il devient ainsi malaisé de prétendre pouvoir déterminer une DL 50 « exacte » sans respecter des conditions draconiennes de réalisation.

L'accroissement du nombre d'animaux dans chaque groupe expérimental est, certes, un moyen permettant d'atténuer l'ampleur de ces fluctuations mais puisque la tendance actuelle est au contraire la réduction de l'effectif animal, on se contente donc de modalités allégées et on ne détermine plus qu'une DL 50 « approximative », ce qui du même coup réduit la charge financière et l'impact humanitaire de ces études.

D'ailleurs, lors de la première Conférence internationale d'harmonisation en 1991, il avait été décidé que la détermination de la DL 50, telle qu'elle était proposée jusqu'alors dans les directives, devait être abandonnée pour les médicaments. Une nouvelle ligne directrice de l'OCDE est en préparation à ce sujet et propose de déterminer la toxicité aiguë à l'aide d'une méthode adaptée aux effets observés, ce qui limite considérablement le nombre d'animaux utilisés (*up and down procedure*). Dans ce cas, les animaux sont traités séparément. La dose administrée est corrigée en fonction des résultats observés sur l'animal précédent (survie ou mort). Cette procédure estime la DL 50 en prenant en compte tous les morts, et elle doit être calculée en utilisant un programme informatique adéquat.

Des méthodes dites « alternatives » ou de « remplacement » où l'on évalue la toxicité cellulaire *in vitro* sont actuellement à l'étude, mais il apparaît que les réponses dépendent fortement des conditions expérimentales. Leur validation, dans l'évaluation de la toxicité potentielle d'un nouveau médicament, nécessitera donc d'en codifier parfaitement le protocole.

III. Détermination de la toxicité par administrations réitérées

Alors que la toxicité aiguë concerne les effets nocifs dus à une dose unique, une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques, dont les médicaments, se fait par la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir en raison de l'accumulation du produit dans les tissus ou par l'intermédiaire d'autres mécanismes (mutations génétiques, embryotoxicité, etc.), et il s'avère important d'identifier toute possibilité de ce genre par des études subchroniques.
« Le but de ces études est l'obtention d'informations relatives à la toxicité d'un produit dans les cas où une exposition réitérée à ce médicament est envisagée, de manière à permettre l'évaluation des risques résultant de son administration thérapeutique, compte tenu des produits de biotransformation.
La durée de ces études sera fonction de l'utilisation préconisée chez l'être humain et la durée prévue d'exposition humaine ».
Cet essai permettra de « mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active ou de l'association de substances actives, et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie » (directive 75/318/CEE).
On procédera donc à ce type d'essai pour les médicaments destinés à une administration prolongée et répétée.

Cette étude fournira :
- des informations sur les effets toxiques potentiels après expositions répétées pendant une période de temps limité ;
- des renseignements sur les organes cibles ;
- la mise en évidence d'effets réversibles, irréversibles ;
- l'existence ou non de phénomènes cumulatifs et d'effets retardés ;
- une base d'appréciation pour le choix des doses en vue des études à long terme.

D'une façon générale, il est souhaitable de réaliser au moins deux épreuves :
- l'une, à court terme, d'une durée de 2 à 4 semaines ;
- l'autre, à long terme, dont la durée dépend des conditions d'exposition de l'homme.

Cette dernière épreuve a pour but de vérifier les limites d'innocuité expérimentale du produit à examiner et sa durée habituelle est comprise entre 3 et 6 mois.
Le choix des espèces animales utilisées est conditionné par les résultats des études de métabolisme et pharmacocinétique.
Les organes cibles et les propriétés pharmacologiques doivent avoir été définis et, autant que possible, être identiques à ceux impliqués dans l'effet thérapeutique chez l'homme.
Enfin il est souhaitable d'employer un produit de référence de la classe thérapeutique envisagée afin de minimiser les risques d'interprétation des phénomènes pathologiques indépendants de l'administration du produit.

A. Toxicité subaiguë

1. Principe de l'essai

La substance à tester est administrée quotidiennement à différentes doses (ou concentrations) à plusieurs groupes d'animaux d'expérience de chaque sexe, à raison d'une valeur de dose par groupe et par jour, et ce pendant une période de 14, 28 ou 90 jours, voire 6 mois selon l'étude envisagée.
Les propriétés et la stabilité de la substance utilisée doivent être précisées. Le ou les lots utilisés ne doivent pas être d'un degré de pureté plus élevés que ceux qui sont destinés au produit final.
Ces essais seront effectués sur deux espèces de mammifères dont l'une est différente des rongeurs. Les espèces animales devront, autant que possible, être choisies sur la base de leur ressemblance avec l'être humain sous l'angle de la pharmacocinétique, y compris la biotransformation du produit.
Le choix de la ou des voies d'administration doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption. Il est utile de choisir plusieurs doses de façon à faire apparaître d'une part, des effets nocifs et d'autre part, de situer la marge de tolérance du produit chez l'animal.
En pratique, on choisira trois doses :
- une forte dose entraînant une toxicité au niveau des organes cibles ou d'autres fonctions ;
- une dose faible qui doit produire des effets pharmacodynamiques ou l'effet thérapeutique souhaité, ou donner des taux sanguins comparables à ceux que l'on désire obtenir chez l'homme ;
- une dose intermédiaire, moyenne géométrique des deux doses précédentes.

Outre la toxicité générale, il est recommandé de porter une attention particulière à la possibilité d'une toxicité locale au site même de l'application dans le cas d'administrations cutanée, pulmonaire, parentérale, etc.

2. Examens à effectuer

Au cours de l'administration, on observe les animaux de manière à déceler toute manifestation éventuelle de toxicité :
- observation minutieuse du comportement ;
- mesures de valeurs quantifiables telles que croissance pondérale, consommation de nourriture, eau, etc. ;
- examens hématologiques, biochimiques ou fonctionnels adaptés (ECG, ophtalmologie, etc.) ;
- analyse des urines.

Les animaux morts au cours de l'étude et les survivants sacrifiés au terme de l'essai sont autopsiés. Les organes sont prélevés et les examens histopathologiques appropriés sont effectués conformément au protocole retenu.
L'évaluation des résultats doit prendre en compte :
- la mortalité ;
- la présence ou l'absence et la gravité des anomalies comportementales et biologiques ;
- l'identification des organes cibles et leurs lésions ;

• tout autre effet toxique, général ou spécifique.

L'étude de toxicité subaiguë doit permettre d'estimer le « niveau sans effet » du produit testé, chez l'animal.

B. Essais de toxicité chronique

Pour la réalisation de ce type d'essais, le rat, le chien et le singe sont les espèces les plus communément admises. Les doses utilisées tiennent compte à la fois de l'usage thérapeutique envisagé pour la nouvelle molécule et des nombreux résultats des études antérieures dans les différentes espèces animales.

L'objectif est de déceler des anomalies que n'auraient pas révélées les épreuves de toxicité précédentes. Les doses utilisées ne doivent pas compromettre la vie des animaux pendant 25 % du temps de l'essai.

En ce qui concerne la durée des études, actuellement de nombreux auteurs estiment qu'un an chez le singe et le chien est suffisant. Rappelons qu'une étude de 18 mois chez le rat correspond à un traitement de 33 ans chez l'homme.

L'examen critique des essais chroniques de 18 mois chez les rongeurs a conduit à intégrer ces études dans le test de cancérogenèse expérimentale. Il convient cependant de remarquer que le protocole d'une étude de toxicité chronique est distinct du protocole d'une étude de cancérogenèse. En conséquence, les résultats de toxicité chronique ne permettent pas de tirer nécessairement des informations quant au potentiel cancérogène éventuel de la substance testée.

Les recommandations actuelles quant à la durée des études de toxicité chronique se limitent à 6 mois pour les études conduites chez les rongeurs, et à 9 mois pour les études avec des non-rongeurs.

Il faut ajouter à ces essais une ligne directrice adoptée en novembre 1994 qui complète la directive 75/318/CEE par des études de distribution tissulaire. En effet, une bonne compréhension des phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination d'un composé est essentielle pour l'interprétation des études de pharmacologie et de toxicologie (ligne directrice S4, *International conference for harmonisation* — ICH —, septembre 1998).

IV. Examen de la fonction reproductrice toxicité embryofœtale et périnatale

A. But et définitions

Ces études sont définies dans la directive 75/318/CEE qui comporte un *addenda* sur la fertilité mâle adopté en 1995.

« L'étude des effets sur la fonction de reproduction sera conduite sur tous les nouveaux médicaments, de façon à mettre en évidence tout effet sur la reproduction des mammifères. Pour cela, l'ensemble des études mises en œuvre doivent prévoir aussi bien une exposition pendant la vie d'adulte que durant tous les stades du développement, c'est-à-dire depuis la conception jusqu'à la maturité sexuelle. Le choix des pro-

tocoles expérimentaux et des observations à effectuer doit donc permettre dans un premier temps la détection de l'effet toxique, des études ultérieures permettant de caractériser plus finement l'effet observé. Par exemple, une réduction de la taille des portées chez un animal donné peut être due à une diminution du taux d'ovulation, à des taux plus élevés de mort lors des stades de pré- ou postimplantation ou à une mort postnatale. De plus, ces morts peuvent être la conséquence de malformations physiques précoces qui peuvent ne pas être observées à des stades plus tardifs de l'évolution. Ainsi, la nature, l'incidence et les origines de la toxicité de la substance doivent être parfaitement caractérisées, et cela en fonction de la dose administrée de façon à évaluer le risque réel lié à l'utilisation de cette substance.

B. Histoire du Thalidomide®

Le Thalidomide® (N-phtaloyl glutarimide) fut commercialisé en Allemagne et en Belgique en 1954, comme hypnotique à action légèrement tranquillisante. Ce composé était considéré, sur la base des résultats expérimentaux toxicologiques effectués selon les normes classiques de l'époque, comme le moins toxique de tous les hypnotiques connus. Il fut utilisé par de nombreuses femmes enceintes. Vers 1959, les obstétriciens constatèrent une augmentation de l'apparition de bébés anormaux. Il s'agissait de véritables petits monstres sans membre ou bien avec des membres ressemblant à des nageoires de phoque, sans vésicule biliaire, etc. Après enquête, on s'aperçut que toutes les mères avaient pris du Thalidomide®. La diffusion de ce médicament fut cessée. On refit de nouveaux essais sur le rat qui ne donnèrent rien, mais aussi sur le lapin et la souris qui révélèrent hélas des effets tératogènes.
La conséquence de cette malheureuse observation démontra qu'il ne fallait pas négliger les effets des médicaments sur l'embryon, que l'on devait se méfier avant d'administrer toute thérapeutique à une femme enceinte et qu'enfin, tous les mammifères ne réagissaient pas de la même manière, notamment aux agents tératogènes. Depuis cette époque, l'étude des effets tératogènes, a été, en conséquence, incluse dans le protocole d'expérimentation toxicologique de toute substance médicamenteuse.

C. Facteurs responsables de malformations

La *tératogenèse* peut être définie comme l'étude des effets produits par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques liés à des changements permanents d'ordre morphologique ou fonctionnel, produits durant l'embryogenèse. Un *tératogène* est un agent capable de produire des malformations congénitales ou d'en accroître l'incidence.
La production d'une malformation dépend de différents facteurs dont les uns sont liés, soit :

- au stade évolutif et à la constitution génétique de l'embryon ;
- à l'état physiologique ou pathologique de l'organisme maternel.

1. Facteurs embryonnaires

Le facteur chronologique, c'est-à-dire le stade évolutif de l'embryon, sa constitution génétique et sa sensibilité spécifique constituent les principaux facteurs embryonnaires à l'origine de malformations.

a) Facteur chronologique

Au cours de l'élaboration des cellules reproductrices (gamétogenèse), il ne semble pas que des facteurs externes, exception faite des *agents mutagènes*, puissent déterminer des altérations capables de provoquer des malformations. En général, les lésions produites à ce stade entraînent généralement la *stérilité* ou une *diminution de la fertilité* dans les cas les plus graves.

Pendant la courte période de segmentation de l'œuf qui aboutit à la constitution du blastocyte (blastogenèse), la sensibilité aux facteurs externes du jeune embryon est très grande. Divers agents peuvent entraîner sa mort : c'est la période d'embryotoxicité maximale. Il en est ainsi, par exemple, avec un antibiotique comme l'actinomycine D.

C'est durant l'embryogenèse, ou période de différenciation des organes, que se situe essentiellement le risque tératogène. Chaque organe passe, en effet, par une période critique maximale. Ainsi, dans l'espèce humaine, les périodes critiques pour les organes ci-après se situent dans les périodes suivantes :

- Système nerveux : du 15ᵉ au 36ᵉ jour ;
- Membres : du 24ᵉ au 50ᵉ jour ;
- Cœur : du 20ᵉ au 40ᵉ jour.

Le type de malformation observé dépend non seulement du facteur chronologique mais aussi de la nature de l'agent tératogène.

Ainsi la cortisone, les rayons X ou le Thalidomide® conduisent respectivement à des malformations du palais, du système nerveux ou du squelette et des membres. Cette action préférentielle peut d'ailleurs varier, pour une même substance, selon l'espèce considérée. Ainsi certains hypoglycémiants produisent chez le rat des malformations oculaires alors que chez le lapin, on observera des anomalies viscérales. De la même façon, le Thalidomide® a induit des malformations des membres chez l'homme alors qu'il entraîne des malformations nerveuses, chez le lapin.

Dans l'espèce humaine, la morphogenèse des organes est achevée à la fin du deuxième mois. À ce moment, l'embryon devient un fœtus car il prend déjà l'aspect d'un nouveau-né. Pendant la longue période fœtale (fœtogenèse : de la 8ᵉ à la 38ᵉ semaine, chez l'homme), on assiste surtout à des phénomènes de croissance. Le fœtus est beaucoup moins sensible que l'embryon aux agents tératogènes. Cependant, de grosses malformations organiques peuvent se produire. Ainsi l'administration à la mère de certaines hormones androgènes peut aboutir, chez le fœtus, à des anomalies génitales (pseudo-hermaphrodisme).

b) Constitution génétique de l'embryon

Une même substance est susceptible d'entraîner des effets différents selon l'espèce, la race et selon les individus d'une même lignée. Ainsi la cortisone est tératogène chez le lapin et la souris alors qu'elle n'est pas nocive pour l'embryon humain.

Ces différences, selon les espèces, sont vraisemblablement liées à des différences de métabolisme.

c) Sensibilité spécifique de l'embryon

Elle diffère de celle de l'adulte. Elle est principalement due à une immaturité métabolique et notamment à l'absence de mécanismes de conjugaison nécessaires à la détoxification.

2. Facteurs maternels

Les conditions physiologiques de la mère (âge, équilibre hormonal, état de la muqueuse utérine, régime alimentaire, etc.), peuvent déterminer des malformations, en dehors de toute cause exogène.
Toute déficience organique (maladie chronique et/ou métabolique : diabète, obésité, hypertension, etc.), peut constituer une condition favorisante pour la production d'une malformation congénitale.

D. Protocoles expérimentaux

Il n'existe pas de règle générale pour l'établissement des protocoles de ces études. Les stratégies seront adaptées en fonction des substances à tester. Toutes ces études sont conduites chez des mammifères dont les données de fertilité, de fécondité et les anomalies du développement sont bien connues. Les femelles doivent être primipares (qui mettent bas pour la première fois).
Toutes les espèces présentent des avantages et des inconvénients. Le rat est l'espèce de choix pour toutes les études de reproduction. Il ne pourra cependant pas être retenu pour les essais d'agonistes de la dopamine. De plus, il est très sensible aux anti-inflammatoires non stéroïdiens en fin de gestation. La souris est moins utilisée en raison de malformations spontanées plus fréquentes que chez le rat, d'une grande sensibilité au stress et de la petitesse des fœtus. Les essais de toxicité de la reproduction chez le lapin sont difficiles à interpréter en raison du manque de données toxicocinétiques et de la difficulté à interpréter les signes cliniques.
Les autres espèces telles que le cobaye, le furet, le hamster, le chien ou les primates, ne sont qu'exceptionnellement choisies lorsque le rat ne peut pas être utilisé.
Dans la conduite des études de reproduction, il y a lieu de tenir compte de la pharmacocinétique du médicament chez la femelle gravide.
Le choix des doses à administrer constitue la phase critique de ce genre d'étude. Le choix de la plus forte dose est basé sur les résultats des autres études déjà réalisées (pharmacologie, toxicité aiguë et chronique, toxicocinétique) ou si ces informations sont insuffisantes sur une étude préliminaire de toxicité subaiguë comprise entre 2 et 4 semaines. Des doses plus basses sont ensuite choisies en fonction des données de cinétique essentiellement.
La voie d'administration est en général celle qui sera préconisée pour l'administration à l'homme.
Pour faciliter la mise en œuvre des protocoles, différents stades du développement ont été définis comme suit :

A. Depuis la période avant l'accouplement jusqu'à la conception : ce stade inclut les fonctions reproductives de l'adulte mâle et de l'adulte femelle, le développement et la maturation des gamètes, le comportement lors de l'accouplement et la fertilisation ;
B. De la conception à l'implantation : ce stade concerne les fonctions reproductives de l'adulte femelle, la préimplantation et l'implantation ;
C. De l'implantation jusqu'à la fermeture du palais secondaire : concerne les fonctions reproductives de l'adulte femelle, le développement embryonnaire et la formation des organes majeurs ;

D. De la fermeture du palais secondaire jusqu'à la fin de la gestation : concerne les fonctions reproductrices femelles, le développement fœtal et le développement des organes ;
E. De la naissance jusqu'au sevrage : adaptation néonatale, développement et croissance ;
F. Du sevrage à la maturité sexuelle.

Pour cela, il est possible de décliner 3 options d'études :

1. Étude fractionnée en 3 segments

- Étude de la fertilité et des stades précoces du développement embryonnaire ;
- Étude du développement pré et postnatal ;
- Étude du développement embryofœtal.

a) Études de fertilité et du développement embryonnaire précoce

Le but de ces études est de déterminer les effets toxiques ou les dérèglements suite à un traitement pendant une période qui débute avant l'accouplement et qui se poursuit jusqu'à l'implantation de l'embryon (évaluation des stades A et B du processus de reproduction). Ainsi, les effets de la substance testée sont évalués sur la maturation des gamètes, le comportement lors de l'accouplement, la fertilité, les stades de préimplantation et d'implantation de l'embryon.

Ces études seront effectuées en général sur une seule espèce si l'on peut montrer que cette espèce est un modèle adapté en comparaison à l'Homme. Sinon, des études chez deux espèces seront conduites.

Les effets sur la spermatogenèse proprement dite seront évalués à partir des études de toxicité par administration réitérée. Lorsque aucun effet n'est détecté au cours de ce type d'étude, le traitement sera en général débuté 2 semaines avant l'accouplement chez la femelle, et 4 semaines chez le mâle. Le traitement doit se poursuivre pendant la durée de l'accouplement et chez la femelle, jusqu'à la période d'implantation de l'embryon. Il faut souligner que les essais de toxicité sur la fertilité mâle ont fait l'objet d'un *addenda* S5 (R2) (ICH, novembre 2005) qui précise que les études histopathologiques sur les testicules sont les essais les plus sensibles pour détecter des anomalies de la spermatogenèse, l'accouplement à une femelle ne permettant pas toujours de les découvrir. Ces essais peuvent être utilement complétés par des analyses du sperme (comptage, mobilité, morphologie).

Pendant l'étude, tous les signes de toxicité seront évalués. Des prélèvements vaginaux seront effectués pendant l'accouplement. La viabilité du sperme sera évaluée. Les mâles peuvent être sacrifiés à tout moment après l'accouplement, les femelles le seront à environ la moitié de la gestation.

Un examen macroscopique de tous les adultes sera effectué avec prélèvement des organes reproducteurs pour des examens histologiques. Le nombre de fœtus vivants et morts sera notifié.

b) Études de péri et postnatalité incluant les fonctions maternelles

Cette étude a pour but de déceler si une substance administrée à des femelles depuis l'implantation jusqu'à la fin de la lactation perturbe la croissance du fœtus, la parturition et la lactation du nouveau-né. Ces études permettent donc d'évaluer l'effet des substances testées sur les stades C à E cités plus haut et permettent en

particulier de regrouper les données sur la durée de la gestation, les conditions de parturition, le développement de la descendance avec des recherches comportementales (réflexes, mouvements spontanés…).

c) Étude des effets sur le développement embryofœtal

Pour la réalisation proprement dite de cette étude, une seule espèce animale est stipulée.
De nombreuses substances peuvent, chez la femelle gestante, franchir la barrière placentaire. La perméabilité du placenta varie en effet au cours de la grossesse et s'accroît progressivement. Les échanges fœtaux-maternels sont réglés par les mêmes lois physiques et chimiques que celles qui président aux échanges à travers les membranes biologiques (diffusion selon la liposolubilité pour les grosses molécules et filtration pour les petites molécules). Rappelons enfin que l'action tératogène peut s'exercer non par l'agent lui-même mais par un métabolite.
Les substances qui traverseront la barrière placentaire peuvent provoquer soit :

- la mort de l'embryon (embryotoxicité) ;
- la mort du fœtus (fœtotoxicité) ;
- des anomalies structurales ou fonctionnelles permanentes (tératogénécité).

Les agents tératogènes, comme on l'a vu, induisent une embryogenèse anormale. Les manifestations finales peuvent alors être un retard de croissance, des malformations ou des désordres fonctionnels.
En pratique, la détermination d'un éventuel effet tératogène d'une substance se réalise de la manière suivante : les femelles gestantes sont traitées depuis l'implantation de l'embryon jusqu'à la période de fermeture du palais secondaire, cela permettant d'évaluer les effets de la substance sur les stades C et D du développement (voir plus haut). Un ou deux jours avant la date présumée de la parturition, les femelles sont sacrifiées et l'utérus est prélevé. Pour chaque animal, le nombre total de sites d'implantation, de sites de résorption, le poids et le sexe des fœtus sont déterminés afin de déceler les anomalies externes, les malformations internes et les anomalies du squelette.
Ces études doivent être effectuées chez deux espèces différentes. Le choix est généralement porté sur le rat pour les rongeurs et le lapin pour les non-rongeurs.

2. Étude globale

Une étude simplifiée sur les rongeurs peut être envisagée en combinant les essais de fertilité et les essais sur le développement pré et postnatal. Dans ce cas, si les résultats restent négatifs tout en ayant administré une « dose » suffisamment élevée et en ayant intégré une observation des fœtus, des études supplémentaires ne sont pas requises chez le rongeur. En revanche, il faudra étudier les effets sur le développement embryofœtal chez une autre espèce.

3. Étude fractionnée en 2 segments

Des études sur deux segments peuvent également être mises en place. Dans ce cas, les effets sur la fertilité et sur le développement pré et postnatal sont étudiés séparément. Le traitement des femelles lors de l'étude de fertilité peut être poursuivi jusqu'au stade de fermeture du palais secondaire, permettant un examen des fœtus.

Ces deux études combinées peuvent ainsi permettre de connaître les effets de la substance sur tous les stades (A à F) du développement tout en diminuant considérablement le nombre d'animaux utilisés dans la première option.

E. Interprétation et limites des résultats

Ces études permettent d'apprécier l'innocuité de la substance administrée sur l'ensemble des processus de la reproduction de l'animal. Pour ce type d'étude, il faut connaître les variations spécifiques de la souche utilisée.
Dans le cas de la tératogenèse, la connaissance des anomalies majeures et mineures, propres à la souche, permet de différencier les anomalies résultant d'une action spécifique du produit testé. Dans l'interprétation de la spécificité des résultats sur la reproduction, les éventuels effets toxiques généraux sur la mère devront être pris en considération.
Il subsiste le problème de la transposition des résultats expérimentaux à la clinique humaine et l'arrière-pensée de la validité de telles épreuves dans la recherche de la sécurité d'emploi. On peut répondre que les données expérimentales montrent que tout ce qui s'est révélé tératogène chez l'homme l'est aussi chez l'animal à des sensibilités d'espèce près. Mais c'est là une question qui dépasse le cadre des fonctions de la reproduction pour concerner l'ensemble de toute expérimentation animale, comme nous le verrons avec les essais de cancérogenèse.

V. Toxicité génique – Recherche du pouvoir mutagène

« On appelle mutation, au sens strict, toute modification brusque et permanente de caractères héréditaires par changement dans le nombre ou la qualité des gènes » (J. Rostand).
La mutagenèse est un processus biologique au cours duquel des agents biologiques (virus), physiques (radiations) ou chimiques, agissant sur le matériel génétique (ADN, chromosomes), provoquent des modifications qualitatives et/ou quantitatives qui peuvent se traduire par la mort cellulaire ou, en cas de survie, par le changement immédiat et définitivement acquis du génotype et du phénotype.
« L'étude du pouvoir mutagène a pour objet de révéler les changements occasionnés par une substance au matériel génétique d'individus ou de cellules ayant pour effet de rendre les successeurs différents, de façon permanente et héréditaire, de leurs prédécesseurs. Cette étude est exigée pour toute nouvelle substance » (arrêté du 2 octobre 1985 ; *JO* du 26 novembre 1985).
On sait qu'il existe une forte corrélation entre les mutations génétiques et le cancer puisque dans les deux cas, il s'agit souvent d'une atteinte génotoxique de l'ADN. Les cancers résulteraient pour beaucoup de mutations induites. Il a d'ailleurs été démontré qu'au moins 90 % des produits cancérogènes possèdent également des propriétés mutagènes. Cela a conduit à l'idée que les tests de mutagenèse, rapides et certainement moins coûteux que l'expérimentation animale à long terme, pourraient être utiles pour prédire le pouvoir cancérogène d'un produit quelconque.

De plus, une relation de cause à effet a pu être démontrée entre l'exposition à des produits chimiques particuliers et l'apparition de cancers chez l'homme, mais ce type de relation n'a pas encore pu être véritablement mis en évidence dans le cas de maladies héréditaires. C'est la raison pour laquelle les tests de génotoxicité ont été largement mis en œuvre afin de prédire l'effet carcinogène de la substance utilisée au cours du test.
Cependant, à l'heure actuelle, la mutation de lignées cellulaires est clairement associée à certaines maladies, c'est la raison pour laquelle la conclusion qui prédit des effets héréditaires de tel ou tel composé est au moins tout aussi valable que celle qui prédirait un effet carcinogène de ce composé.

A. But des essais de mutagenèse

Les essais de mutagenèse ont trois objectifs :
- détecter et évaluer le pouvoir mutagène ;
- évaluer les risques génétiques (mutation de gène, mutation chromosomique et lorsque c'est possible, mutation du génome) ;
- rechercher un éventuel potentiel cancérogène.

Les procédés choisis doivent tenir compte du fait que l'organisation du matériel génétique est très différente entre les eucaryotes et les procaryotes, et que la capacité de métaboliser un xénobiotique varie selon les organismes, d'où la nécessité d'intégrer à chaque étude un test *in vivo*.

B. Principes des essais de mutagenèse

Trois principes sont à la base de la stratégie en toxicologie génétique :
- L'ADN est dépositaire du code génétique des fonctions cellulaires ; n'importe quelle atteinte quantitative et/ou qualitative de l'ADN peut entraîner une mutation ;
- L'ADN représente le matériel génétique de tous les organismes à l'exception de certains virus ; tout agent qui affecte l'ADN d'un organisme (uni ou pluricellulaire) peut théoriquement affecter l'ADN des cellules humaines ;
- Des mutations spontanées existent ; leur fréquence peut être augmentée par des agents mutagènes.

En conséquence de ces trois principes, tous les effets observables au cours de la mutagenèse peuvent être pris comme critères d'une action mutagène et tous les organismes à ADN peuvent être utilisés comme effecteurs, depuis les organismes simples tels les champignons, jusqu'aux diverses espèces de mammifères, en passant par les insectes.
Les lésions causées au patrimoine génétique peuvent être classées en mutations géniques et mutations chromosomiques :
- les mutations géniques peuvent avoir lieu dans l'ADN de façon ponctuelle (substitution de paires de base par exemple), toucher plusieurs loci ou provenir de petites délétions d'un chromosome ;
- les mutations chromosomiques résultent d'une altération de la structure du chromosome (délétions, inversions et translocations) ;
- les mutations génomiques qui résultent de la modification du nombre de chromosomes.

Il est également possible d'étudier les altérations primaires de l'ADN en mesurant la stimulation ou l'inhibition des recombinaisons impliquées dans la réparation de l'ADN.
Les principes des tests de génotoxicité sont exposés dans une directive européenne de février 1987 sur la base juridique de la directive 75/318/CEE. Ces recommandations ont été récemment revues au cours de la Conférence internationale d'harmonisation (ICH) des procédés pour l'enregistrement des médicaments à usage humain qui a abouti à l'édition d'un texte en 1997 qui s'intitule *Genotoxicity, a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals*.

C. Les recommandations actuelles

Au *Journal officiel des communautés européennes* (*JO* du 16 mars 1987), il est proposé d'effectuer le contrôle du pouvoir mutagène des spécialités pharmaceutiques en utilisant un système comportant quatre catégories de tests. Toutefois, il ne faudrait pas en déduire que d'autres tests sont inadéquats, ou que les éléments de preuve découlant d'autres tests ne peuvent pas constituer une alternative acceptable à une partie de la batterie de tests.
En 1997, le rapport de la Conférence internationale d'harmonisation conseille de mettre en œuvre une batterie de tests correspondant aux trois points suivants :
- un essai de mutation génique sur les bactéries (ligne directrice S2B, ICH, juillet 1997) ;
- un essai *in vitro* d'évaluation cytogénétique des altérations chromosomiques sur des cellules de mammifères, ou un test *in vitro* de mutation ponctuelle qui implique le locus tk (thymidine kinase) sur des cellules de lymphome de souris ;
- un essai *in vivo* d'altération chromosomique sur des cellules hématopoïétiques de rongeur.

Les lignes directrices de l'OCDE proposent une quinzaine d'essais visant à mettre en évidence les trois types de lésions précédentes.

1. Essais relatifs aux mutations géniques

Il s'agit des tests les plus couramment utilisés pour l'évaluation des propriétés mutagènes des produits chimiques. On utilise plusieurs souches bactériennes bien établies pour la détection de divers types de mutations génétiques, y compris les mutations par décalage du cadre de lecture (*frame shift*) et les mutations par échange de base. Étant donné que l'activité mutagène des agents chimiques se manifeste le plus souvent par l'intermédiaire de leurs produits de métabolisme, ces tests sont effectués avec (extraits tissulaires) et sans activation métabolique extrinsèque.
Parmi ces tests, le plus connu est certainement celui proposé par Ames et coll. en 1975. Des bactéries de souches spécifiques de *Salmonella typhimurium* porteuses d'une mutation « his – » qui les rend incapables de pousser sur un milieu dépourvu d'histine deviennent, sous l'action d'un agent mutagène, « his + », c'est-à-dire capables de se développer sur ce milieu dépourvu d'histidine.
D'autres essais, relatifs aux mutations géniques dans les cellules eucaryotes, utilisent :
- des bactéries : *Escherichia coli* ;

- des levures : *Saccharomyces cerevisiæ* ;
- des cellules de mammifères en culture : cellules de lymphome de souris ou cellules CHO de hamster chinois ;
- des insectes : *Drosophila melanogaster* ;
- des rongeurs, comme la souris, dans le *spot test*.

2. Essais relatifs aux aberrations chromosomiques

Les essais les plus simples et les plus sensibles pour étudier les effets clastogènes (c'est-à-dire cassures des chromosomes) sont ceux qui se réalisent sur des cultures de mammifères. Ces tests permettent d'identifier les produits chimiques capables d'endommager des chromosomes de mammifères dans un système expérimental *in vitro*.

Pour rechercher si un produit chimique est capable d'endommager les chromosomes d'un mammifère vivant, on dispose de deux méthodes *in vivo* bien établies sur des cellules de moelle osseuse de rongeurs chez lesquels, après administration de l'agent suspect, on compte les micronucléi dans les érythrocytes polychromatiques ou bien on analyse les chromosomes des cellules en métaphase. Par ailleurs, on peut détecter les produits chimiques susceptibles d'endommager les chromosomes des cellules germinales en utilisant l'essai de la mutation létale dominante, un essai sur les aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies ou, dans certains cas, l'essai sur la translocation héréditaire chez la souris. Ce dernier test est le seul, parmi ces essais, qui puisse révéler les altérations réellement transmissibles chez un animal vivant.

3. Essais relatifs aux effets sur l'ADN

Trois lignes directrices de l'OCDE décrivent des méthodes généralement acceptées comme essais pouvant montrer les effets sur l'ADN, induits par des produits chimiques. Une des réponses de la cellule à de telles atteintes est l'initiation de la réparation enzymatique de la lésion qui comprend la dégradation de la partie endommagée et ensuite la synthèse d'un segment, relativement court, d'ADN, pour remplacer la région atteinte. Une telle réparation, appelée « synthèse non programmée d'ADN » ou « UDS » (pour la différencier de la synthèse qui a lieu au cours de la duplication normale de la cellule), est à la base de l'essai d'UDS sur les cultures de cellules de mammifères.

On peut également étudier les *crossing over* mitotiques (échanges de segments d'ADN entre des gènes, ou entre un gène et son centromère et la conversion génique – transferts de segments d'ADN à l'intérieur d'un gène –) chez la levure *Saccharomyces cerevisiæ*. Ces phénomènes sont considérés comme des indicateurs utiles d'une lésion primaire de l'ADN.

L'étude de l'échange de chromatides sœurs dans des cultures de cellules de mammifères entre aussi dans cette catégorie d'essais. Le mécanisme moléculaire de la formation d'un échange de chromatides sœurs reste encore à élucider parfaitement, mais on a montré qu'il était différent du mécanisme aboutissant à la cassure de chromosomes et l'essai d'échange de chromatides sœurs est une méthode utile pour identifier les produits chimiques qui affectent l'ADN.

D. Interprétation des résultats

L'objectif des procédures des tests de mutagenèse est de déterminer, avec un degré de certitude raisonnable, si une substance possède ou non un potentiel mutagène. Il faudra, ensuite, évaluer les résultats obtenus en terme de risque génétique pour l'homme. Si tous les résultats indiquent, de manière convaincante, qu'une substance thérapeutique n'a aucun effet, quel que soit le test utilisé, on peut conclure que le risque de mutagénicité est suffisamment faible pour être acceptable. Si, au contraire, les tests aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* indiquent que le composé a des propriétés mutagènes, on peut argumenter que ce médicament présente un risque pour l'homme. Malheureusement, les résultats ne sont pas toujours aussi nets et dans ce cas l'interprétation est plus délicate.
Les résultats des essais de mutagenèse interprétés en terme de cancérogenèse doivent être considérés avec la plus grande réserve car, si la plupart des cancérogènes sont reconnus mutagènes dans un ou plusieurs systèmes, la relation inverse n'est pas démontrée.

VI. Essais de cancérogenèse

Les modalités de réalisation des études de cancérogenèse d'une substance entrant dans la composition d'un médicament destiné à être mis sur le marché dans un pays membre de la CEE font l'objet d'une réglementation applicable dans tous les pays membres, et sont résumées dans la recommandation 83/571/CEE. La CEE exige, en particulier, la réalisation d'études d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'accumulation éventuelle et/ou d'effets inducteurs enzymatiques avant le début des essais de cancérogenèse.

A. Nécessité des études de cancérogenèse

Des expérimentations de nature à révéler des effets cancérogènes sont indispensables :
- pour les produits qui présentent une analogie chimique étroite avec des composés reconnus cancérogènes ou cocancérogènes ;
- pour les produits qui, lors de l'étude toxicologique à long terme, ont provoqué des manifestations suspectes ;
- pour les produits dont on a observé des résultats suspects au cours des tests de mutagenèse ou lors des tests de cancérogenèse à court terme.

« De telles expérimentations peuvent également être demandées pour les substances entrant dans la composition des spécialités pharmaceutiques, susceptibles d'être régulièrement administrées au cours d'une période substantielle de la vie » (directive 87/29/CEE).
Les essais de cancérogenèse ne sont pas obligatoirement requis lorsque la substance en question sera utilisée chez des malades dont l'espérance de vie est inférieure au temps nécessaire pour que le pouvoir cancérogène puisse se manifester, ou encore dans le cas des substances insolubles non absorbées.
Les modalités des expériences doivent être déterminées en tenant compte de l'état des connaissances scientifiques au moment du dépôt du dossier.

B. Rappels préliminaires

Par définition, la cancérogenèse est un processus pathologique caractérisé par l'apparition de cellules différentes des cellules normales dans un organisme.
Ces cellules, devenues malignes, sont définies par deux propriétés qu'elles transmettent à leur descendance :

- elles se divisent de manière anarchique et n'obéissent plus aux signaux de régulation ;
- elles envahissent les zones extérieures aux tissus où elles sont apparues. Elles détruisent le tissu de voisinage et peuvent migrer à distance du foyer tumoral par voie sanguine ou lymphatique, et créer des foyers secondaires (métastases) au niveau du foie, du poumon, des os et des ganglions.

Un agent cancérogène est un agent physique (RX, radiations), chimique (direct ou intermédiaire électrophile) ou biologique (virus) qui, seul ou en association, est capable pour une espèce animale donnée :

- d'induire des tumeurs, non spontanément présentes chez les témoins de l'expérience ;
- et/ou d'augmenter l'incidence de certains types de tumeurs, spontanément présentes chez les témoins de l'expérience ;
- et/ou de raccourcir significativement le temps de latence des tumeurs spontanées.

Parmi les agents cancérogènes, on distingue :

- les cancérogènes primaires : ce sont des agents qui induisent directement des tumeurs. Ils agissent le plus souvent au point d'application et parfois dans les tissus les plus proches. Ils n'ont pas besoin d'activation métabolique mais sont sujets à la détoxification et à l'excrétion. Il s'agit essentiellement des agents alkylants : époxydes, lactones, esters, moutardes azotées, etc. ;
- les cancérogènes secondaires ou indirects : excepté certains types de produits chimiques, ils n'agissent pas au point d'application mais souvent touchent un tissu spécifique ; ils doivent, pour être actifs, subir une activation métabolique. Ce sont des agents procarcinogènes. La plupart des agents cancérigènes connus appartiennent à cette catégorie. Il s'agit des hydrocarbures aromatiques polynucléaires, de certaines amines aromatiques, des nitrosamines et substances apparentées et enfin de certains hydrocarbures halogénés (chlorure de vinyle) ;
- les cocancérigènes ou promoteurs : ce sont des agents qui favorisent le développement des tumeurs vraisemblablement par un effet additif ou par un effet amplificateur avec des agents reconnus cancérogènes.

Actuellement, les études permettant d'évaluer un potentiel cancérogène peuvent être regroupées en trois catégories :

- *les études à court terme* : qui sont seulement des essais indicatifs, incluant les essais de transformations cellulaires en culture de tissus, certains essais à court terme *in vivo* (tests cutanés, par exemple) et des essais de mutagenèse ;
- *les études à long terme*, dont les résultats sont prédominants dans l'évaluation du pouvoir cancérogène ;
- *les études épidémiologiques humaines* dont la valeur est déterminante mais toujours tardive en termes de prévention.

C. Principe des essais de cancérogenèse

Il est actuellement recommandé que les essais soient conduits chez l'animal en choisissant la même voie d'administration que celle qui sera préconisée chez l'homme. Lorsque le métabolisme et l'exposition systémique à la substance peuvent être démontrés identiques, une seule voie d'administration pourra être envisagée.

Le principe des essais de cancérogenèse à long terme est de traiter par voie orale, cutanée ou respiratoire, un nombre important d'animaux dès que possible après le sevrage et pendant la majeure partie de leur vie. En règle générale, on recommande un traitement d'au moins 24 mois pour les souris et hamsters et de 30 mois pour les rats, suivi ou non d'une période d'observation. Ce type d'étude doit être conduit sur au moins deux espèces. La substance est administrée à plusieurs groupes d'animaux des deux sexes (50 animaux par sexe par lot traité, ainsi que 2 lots témoins de 50 animaux par sexe recevant l'excipient seul par la même voie).

Une étude à long terme chez une espèce de rongeur peut être complétée soit par une étude à long terme chez une autre espèce, soit par une étude à court ou moyen terme pouvant inclure des animaux transgéniques ou des études effectuées au stade néonatal. Ces études à court terme ou à moyen terme sont en général effectuées pour rechercher le mécanisme d'action de la drogue.

Les essais doivent normalement être effectués à trois niveaux posologiques.

Le choix des doses à administrer est plus que jamais déterminant pour la validation de ce type de test. Le choix de la plus forte dose est particulièrement délicat. Il pourra s'agir de la dose maximum tolérée, déterminée au cours des essais de toxicité subchronique de 90 jours, de la dose qui donne l'effet pharmacodynamique maximum, de la dose maximum administrable, ou de 25 fois le rapport de la dose plasmatique (AUC) chez l'homme par rapport au rongeur.

Par ailleurs, dans l'état actuel des connaissances, il ne semble pas nécessaire de conduire ces études avec des doses supérieures à 1 500 mg/kg/jour dans les cas où la substance ne présente pas d'effets génotoxiques et que la dose recommandée pour l'usage humain n'excède pas 500 mg/jour.

L'étude permettra par des examens cliniques, biologiques et anatomopathologiques détaillés, la détection et la description d'hyperplasie, des tumeurs bénignes et malignes ainsi que des métastases touchant tous les tissus et organes.

D. Interprétation et limites des résultats

Les résultats d'un essai de cancérogenèse *in vivo*, bien conçu, bien conduit et bien interprété, devraient indiquer, après une analyse statistique adéquate, si la substance est cancérogène dans les conditions opératoires adoptées. Ainsi, la substance sera déclarée cancérogène pour une espèce quand les résultats seront statistiquement significatifs et reproductibles. L'analyse sera, en particulier, axée sur l'évaluation de l'existence d'un effet quelconque de la substance étudiée sur les lots « Essai » par rapport aux lots « Témoin » ainsi que l'évaluation, pour chaque effet constaté, de l'existence d'une relation effet/dose pour les trois niveaux posologiques étudiés.

La majorité des substances cancérogènes chez l'homme s'est également révélée cancérogène sur au moins une espèce animale, alors que parmi les substances

démontrées cancérogènes chez l'animal, certaines seulement se sont montrées cancérogènes pour l'homme.
Le potentiel cancérogène d'une substance sera donc évalué en fonction des divers résultats expérimentaux disponibles sur différentes espèces, et démontré éventuellement après une étude épidémiologique.

L'essentiel de la question

La mise sur le marché d'un médicament nécessite l'obtention d'une autorisation (AMM) qui est délivrée lorsque toutes les conditions d'efficacité, de tolérance, de qualité de fabrication de la nouvelle substance sont démontrées.
Une documentation pharmaco-toxicologique préclinique doit être parfaitement étayée, renforcée par un dossier d'expertise afin de démontrer les effets de la substance et d'évaluer les dangers liés à son utilisation. Plusieurs directives ont été adoptées par la communauté européenne afin de définir les essais de toxicologie expérimentale requis pour évaluer la sécurité des médicaments. Ces essais concernent la détermination de la toxicité par administration unique, la détermination de la toxicité par administration réitérée, les études de toxicité sur les fonctions de reproduction, les essais de génotoxicité avec la détermination du potentiel mutagène et les essais de cancérogénicité.
Afin de garantir une protection de la santé et de l'environnement, des directives ont été adoptées afin de promouvoir la qualité et la validité des résultats de tous ces essais. Il s'agit des recommandations de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) qui demandent l'établissement d'un programme d'assurance-qualité dans chaque laboratoire de toxicologie expérimentale. L'organisation-qualité qui découle de l'application des bonnes pratiques de laboratoire permet de maîtriser toutes les étapes de planification, de réalisation, de contrôle, d'enregistrement et de diffusion des études. C'est cette maîtrise et la traçabilité qui en découle qui assurent la qualité des essais.

Pour en savoir plus

- Autorisation de mise sur le marché des spécialités pharmaceutiques. Constitution des dossiers de demandes. *Bulletin Officiel* n° 88/26 bis 1988.
- Bromont P., Lantz B. *Évaluation de la sécurité d'emploi des médicaments*. Doin, Paris 1989.
- Conférences internationales d'harmonisation. Nouvelle nomenclature, lignes directrices S1-S8, M3, novembre 2005. Instruction du 31 mai 1983 relative aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) dans le domaine de la toxicologie expérimentale. Ministère des Affaires sociales et de la Solidarité nationale (non parue au *Journal officiel*).
- Instruction du 3 septembre 1984 relative aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) quant à la conduite d'une inspection dans le domaine de la toxicologie expérimentale. Ministère des Affaires sociales et de la Solidarité nationale (non parue au *Journal officiel*).
- Laroche M.-J., Fabiani P., Rousselet F. *L'expertise toxicologique des médicaments*. Masson, Paris 1986.
- *Lignes directrices de l'OCDE pour les produits chimiques*. OCDE, Paris.
- Ministère de la Solidarité, de la Santé et de la Protection sociale.

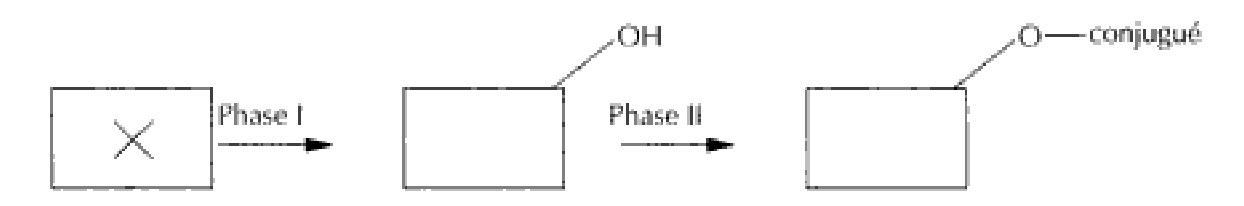
Les biotransformations des médicaments et des toxiques

A.M. BATT†, M.H. LIVERTOUX, L. FERRARI
Centre du Médicament, Faculté de Pharmacie, Nancy.
J.-Y. LE TALAER, Département de Biochimie-Toxicologie,
Faculté de Pharmacie, Caen (révision 2007).

Les biotransformations sont un très grand chapitre de la pharmacologie et de la toxicologie. De nombreuses réactions permettent la transformation en vue de l'élimination des médicaments et des toxiques.
Les systèmes enzymatiques responsables de ces biotransformations métabolisent aussi bien des substances étrangères à l'organisme, médicaments ou toxiques, que l'on nomme « xénobiotiques » (étymologiquement : étrangers à la vie), que des substances naturelles à l'organisme des mammifères (stéroïdes, vitamines, acides gras, bilirubine).
Bien que long, ce chapitre n'est pas exhaustif. Il ne s'intéresse qu'aux systèmes enzymatiques les plus importants en sciences du médicament.

I. Les phases du métabolisme

Il est habituel de séparer les réactions de biotransformation en deux phases.
La phase I comporte surtout des réactions d'hydrolyse et d'oxydation, elle est également nommée phase de fonctionnalisation, car elle crée sur la molécule à transformer un groupement fonctionnel qui sera attaqué par la réaction de phase II.
La phase II regroupe les réactions de conjugaison sur un cosubstrat. Le conjugué obtenu est en général très peu réactif chimiquement et très peu actif pharmacologiquement et toxicologiquement. Lorsque la molécule mère est déjà porteuse d'un groupement fonctionnel susceptible d'être conjugué, une réaction de phase II peut avoir lieu, sans réaction de phase I préalable.

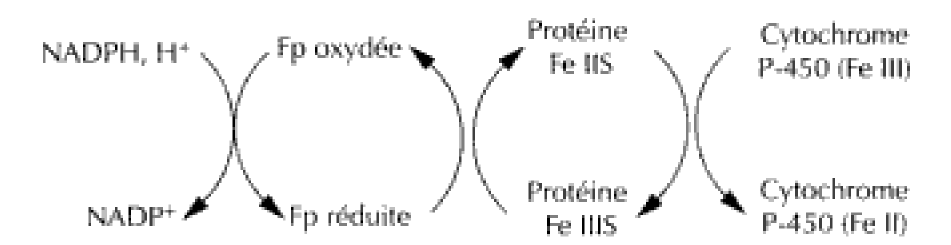


II. Les réactions de phase I

A. Le système des monooxygénases à cytochrome P-450

Un système monooxygénase est un système multienzymatique, capable d'oxyder une substance en lui transférant directement un atome d'oxygène (et un seul) à partir d'oxygène moléculaire.
Ce système comprend :
- un donneur d'électrons : NADPH (et accessoirement NADH) ;
- une chaîne de transfert d'électrons qui comporte au moins :
  - la NADPH cytochrome P-450 oxydoréductase, encore nommée NADPH cytochrome c réductase en raison du substrat utilisé pour mesurer son activité. De masse moléculaire 78 000 Da environ, cette flavoprotéine est entourée de plusieurs cytochromes P-450 qui reçoivent d'elle les électrons,

- le cytochrome P-450, oxydase terminale du système. Un cytochrome P-450 est une hémoprotéine. La protoporphyrine IX est son groupement prosthétique,
- l'apoprotéine de masse moléculaire 45 000 à 55 000 Da est variable, ce qui fait que les cytochromes P-450 sont une vaste « superfamille », dont chaque famille, et parfois chaque protéine, possède des caractéristiques propres de substrat. Cette spécificité n'est pas toujours stricte, différents cytochromes peuvent prendre en charge un même substrat, la spécificité est alors dite « chevauchante »,
- en milieu réducteur (dithionite de sodium), et en présence d'oxyde de carbone, l'hémoprotéine absorbe à 450 nm, d'où son nom,
- le cytochrome b5 contribue au transfert d'électrons à partir de NADPH et de NADH.



La matrice membranaire lipidique est indispensable au fonctionnement du système. La plupart des monooxygénases à cytochrome P-450 appartiennent au réticulum endoplasmique. Lorsque le système est isolé et reconstitué il faut l'inclure dans des liposomes comportant une proportion adéquate de phosphatidylcholine.

B. Le cycle du cytochrome P-450

1. 1re étape

C'est la fixation de la substance sur la zone hydrophobe de l'apoprotéine. Le fer reste à l'état ferrique. La liaison entre l'apoprotéine et le fer (5e ligand) est maintenue ; en revanche, la liaison du fer avec un acide aminé de la zone hydrophobe est rompue.

2. 2e étape

C'est l'arrivée du premier électron. L'équivalent réducteur provient de NADPH + H^+, il est transféré par la réductase.
Le fer du noyau héminique passe à l'état ferreux.

3. 3e-4e étapes

C'est l'arrivée de l'oxygène moléculaire qui se fixe sur le fer réduit. On obtient un oxycomplexe. Les états d'oxydation du fer sont en équilibre entre Fe II et Fe III.

4. 5e étape

C'est l'arrivée du deuxième électron, pour obtenir un complexe oxénoïde. Cet électron est transféré par la réductase ainsi que par le cytochrome b5. Le complexe obtenu est dit « oxénoïde ».

5. 6e étape

Un atome de l'oxygène fixé sur le fer est transféré à la substance à métaboliser et celle-ci est libérée. Le second atome d'oxygène réagit avec le proton et produit H_2O.

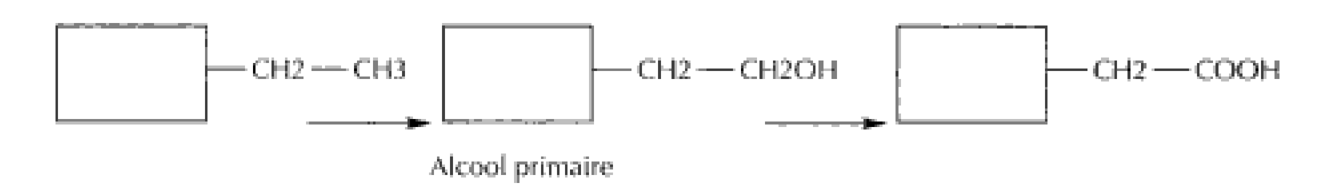
Figure 1. Cycle catalytique P-450 (XH représente le substrat et XOH le métabolite hyroxylé)

C. Les principales réactions dépendantes du système monooxygénase

Les monooxygénases sont capables d'effectuer un grand nombre de réactions qui sont essentiellement des réactions d'oxydation, mais des réactions de réduction sont également possibles.

1. Hydroxylation aliphatique

Réaction très commune qui conduit à des alcools primaires ou secondaires.



2. Hydroxylation aromatique

Réaction très importante, dont la biotransformation du benzène est un modèle. Le produit principal de la réaction est un phénol, mais des catéchols et des quinols peuvent aussi être produits. L'hydroxylation aromatique s'effectue généralement via la formation d'un intermédiaire époxyde. Le déplacement d'un atome d'hydrogène au cours de cette réaction est dénommé « *NIH shift* », en raison du lieu de sa découverte (le *National Institute of Health*, Bethesda, USA). Les époxydes sont normalement instables, cependant les époxydes des hydrocarbures polycycliques sont suffisamment stables pour être isolés. Les époxydes se décomposent pour conduire aux phénols, ou bien ils sont substrats des époxydes hydrolases ou encore des glutathions-S-transférases.

Benzène → Époxyde → Phénol (OH) ; → Diol (OH, OH)

3. Les O-, S-, N-, déalkylations

Ce type de réaction intervient sur beaucoup de médicaments et de toxiques contenant un groupement alkyl fixé sur l'oxygène, le soufre ou l'azote. Ce groupement alkyl est éliminé de façon oxydative et produit l'aldéhyde correspondant. Différents P-450 sont responsables de la O-déalkylation de différents substrats. On ne peut pas établir de relation *a priori* entre l'atome à déalkyler et le cytochrome P-450 responsable.

$$R-NH-CH_3 \rightarrow R-NH-CH_2OH \rightarrow R-NH_2 + HCHO$$

N-déalkylation

$$R-O-CH_3 \rightarrow R-O-CH_2OH \rightarrow R-OH + HCHO$$

O-déalkylation

$$R-S-CH_3 \rightarrow R-S-CH_2OH \rightarrow R-SH + HCHO$$

S-déalkylation

4. N-hydroxylation

La N-hydroxylation des arylamines primaires, des amides et des hydrazines conduit à l'hydroxylamine correspondante. Dans le cas de l'aniline, la phénylhydroxylamine est oxydée en nitrosobenzène, qui peut lui-même être réduit en phénylhy-

droxylamine. Ce mécanisme d'oxydoréduction est tenu pour responsable de la méthémoglobinémie causée par l'aniline.

5. N-oxydation

Cette réaction conduit à un N-oxyde à partir d'amines secondaires ou tertiaires. Elle peut être effectuée par les monooxygénases à cytochrome P-450, mais également par d'autres monooxygénases dites à flavine.

(R3)—N → {(R3)—N—OH} → (R3)—N^+—O^- + H^+
Amine tertiaire — N-oxyde

(R2)—NH → (R2)—NHOH
Amine secondaire

R—CO—NH2 → R—CO—NHOH
Amide

6. S-oxydation

Cette réaction conduit à un sulfoxyde et à une sulfone. L'oxydation du soufre des phénothiazines constitue un exemple.

7. Déhalogénations oxydative et réductive

Les solvants chlorés et les anesthésiques comme l'halothane sont métabolisés de cette manière. Dans le cas du tétrachlorure de carbone, la déhalogénation réductive conduit au chloroforme. Il y a production de radical libre au cours de cette réaction.

$$R1-CH(R2)-X \longrightarrow R1-C(OH)(R2)-X \longrightarrow R1-C(R2)=O + HX$$

Déhalogénation oxydative

$$R1-C(R3)(R2)-X \xrightarrow{e^-} R1-C^{\bullet}(R3)(R2)-X^- \xrightarrow{H^+} R1-CH(R3)(R2) + HX$$

Déhalogénation réductrice

Si ces réactions conduisent le plus souvent à l'inactivation des xénobiotiques par la production de composés légèrement plus hydrosolubles et moins actifs que le produit parental, elles peuvent aussi créer des composés toxiques. En effet, les CYPs sont également les principales enzymes responsables de l'activation des carcinogènes chimiques. Les métabolites réactifs peuvent alors se fixer sur les molécules cellulaires (protéines, ADN) et être à l'origine d'un processus de toxication cellulaire ou de carcinogenèse.

Tous les CYPs ne sont pas impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ; certains d'entre eux sont également impliqués dans le métabolisme de composés endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires, les prostaglandines, les leucotriènes et les hydroperoxydes lipidiques.

D. Les cytochromes P-450

Les monooxygénases à cytochrome P-450 sont essentielles pour effectuer des biotransformations de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes...) *(tab. 1)* aussi bien que celles de très nombreux médicaments et toxiques naturels (végétaux par exemple) ou de synthèse *(tab. 2)*. Dans le système monooxygénase, la variété des propriétés catalytiques provient de la variété de la partie protéique du cytochrome P-450. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les cytochromes P-450 ont été répartis en familles et sous-familles.

La nomenclature actuelle des cytochromes P-450, consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole *CYP*, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène (ex. : *CYP 1A1*). Pour désigner l'ARNm ou la protéine enzymatique, la même nomenclature est employée sans italique.

La purification et le séquençage de nombreux CYPs ont été réalisés dans différents laboratoires. 481 gènes et 22 pseudogènes sont actuellement identifiés et séquencés à partir de plantes, bactéries, animaux et levures (Nelson *et coll.*, 1996). Il existe 51 gènes chez l'homme, dont 10 pseudogènes, répartis en 16 familles (http://drnelson.utmem.edu/nelsonhome.page.html).

Tableau 1. Types de réactions métaboliques catalysées par les diverses familles de CYPs chez l'homme (http//drnelson.utmem.edu/nelsonhome.page.html)

Famille	Type de métabolisme
CYP 1	Métabolisme des xénobiotiques
CYP 2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP 3	Métabolisme des xénobiotiques
CYP 4	Métabolisme de l'acide arachidonique et des acides gras
CYP 5	Thromboxane A2 synthétase
CYP 7A	Biosynthèse des acides biliaires
CYP 7B	7α hydroxylase
CYP 8A	Prostacycline synthétase
CYP 8B	Biosynthèse des acides biliaires
CYP 11	Biosynthèse des stéroïdes
CYP 17	Biosynthèse des stéroïdes
CYP 19	Biosynthèse des stéroïdes
CYP 21	Biosynthèse des stéroïdes
CYP 24	Dégradation de la vitamine D
CYP 26	Acide rétinoïque hydroxylase
CYP 27	Biosynthèse des acides biliaires
CYP 40	Vitamine D3 1α hydroxylase
CYP 51	Biosynthèse du cholestérol

Tableau 2. Exemples de substrats des principales sous-familles de CYPs chez l'homme

CYPs	Substrats
CYP 1A1	Benzo(a)pyrène, autres hydrocarbures polycycliques aromatiques
CYP 1A2	Phénacétine, aflatoxine B1, caféine, arylamines hétérocycliques, théophylline, acétaminophène, imidazole, imidazoquinoline, aminofluorène, chlorzoxazone
CYP 2A6	Coumarine
CYP 2B6	Coumarine
CYP 2C8/9	Méphénytoïne
CYP 2D6	Débrisoquine
CYP 2E1	Alcools, acétones, nitrosodiméthylamines, chloroforme, styrène, acétonitrile, chlorzoxazone, acétaminophène, tétrachlorure de carbone, vinyles
CYP 3A4/5	Nifédipine, aflatoxine B1, cyclosporine, testostérone, éthinylestradiol, rifampicine, érythromycine, benzphétamine, lovastatine, midazolam
CYP 4A9/11	Acides gras (oxydation et hydroxylation)
CYP 4B1	Testostérone, coumarine

En règle générale, les CYPs appartenant à une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence. À l'intérieur d'une même sous-famille, l'homologie de séquence en acides aminés est supérieure à 55 %. Actuellement, tous les gènes répertoriés comme appartenant à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome (« cluster de gènes »).
Chez les mammifères et particulièrement chez l'homme, 4 familles sont importantes pour le métabolisme, surtout hépatique, des médicaments.
Il s'agit des sous-familles suivantes :
- sous-famille 1A ;
- sous-familles 2A, 2B, 2C, 2D, 2E ;
- sous-famille 3A ;
- sous-famille 4A.

1. L'induction *(tab. 3 et 4)*

L'induction enzymatique est l'augmentation de la quantité d'une protéine. Si d'un point de vue global on se réfère le plus souvent à une augmentation de la transcription, il existe également des mécanismes mettant en œuvre des augmentations de la stabilité ou une diminution de la dégradation des ARNm ou de la protéine elle-même.
Historiquement, le premier mécanisme d'induction identifié à propos des enzymes du métabolisme des médicaments concerne l'augmentation du CYP 1A1 après traitement par des hydrocarbures polycycliques aromatiques (type dioxine). Le mécanisme implique un récepteur spécifique, le récepteur Ah, qui se fixe à l'hydrocarbure dans le cytoplasme et est ensuite transloqué dans le noyau pour se lier à une séquence de réponse consensus (XRE – « *Xenobiotic responsive element* ») présente dans le promoteur du gène de la protéine induite.
La régulation fine de ce mécanisme comporte une seconde protéine dite ARNT (Ah *Receptor Nuclear Translocator*), des protéines de stress (hsp90), et des mécanismes de phosphorylation par des kinases de type PKC ou PKA. Les enzymes répondant à ce type de mécanismes sont les P-450 de famille 1, et certaines UGTs.
En ce qui concerne le P-450 majoritaire dans le foie humain (CYP 3A), son induction par des molécules de tailles diverses et de classes thérapeutiques variées a fortement retardé la compréhension des mécanismes mis en œuvre. C'est très récemment l'identification du récepteur à la prégnénolone et la présence d'une séquence

Tableau 3. Médicaments inducteurs des cytochromes P-450

1A2	2C19	2C9	2D6	2E1	3A4,5,7
Brocoli ? Choux de Bruxelles ? Insuline Méthyl-cholanthrène Nafcillin ? Bêta-napthoflavone Oméprazole Tabac	Carbamazépine ? Noréthandrolone	Rifampicine Sécobarbital	Dexaméthasone ? Rifampicine ?	Éthanol Isoniazide	Barbituriques Carbamazépine Glucocorticoïdes Phénobarbital Phénytoïne Rifampicine Troglitazone Lovastatine Fluvastatine

D'après David A. Flockhart, site internet, URL : http://www.dml.georgetown.edu/depts/pharmacology/davetab.html.

Tableau 4. Médicaments inhibiteurs des cytochromes P-450 (Ki)

1A2	2C19	2C9	2D6	2E1	3A4,5,7
Amiodarone Cimétidine Fluoroquinolones Fluvoxamine (0,2 µm) Furafylline Interféron ? Méthoxalène Mibéfradil Ticlopidine	Cimétidine Felbamate Fluoxétine Fluvoxamine Indométacine Kétoconazole Lansoprazole Oméprazole Paroxétine ? Probénécide Ticlopidine Topiramate	Amiodarone Fluconazole Fluvastatine Isoniazide Lovastatine Paroxétine ? Probénécide Sertraline Sulfaphénazole (0,5 µm) ? Triméthoprime Zafirlukast ? Phénylbutazone	Amiodarone Chlorphéniramine Cimétidine Clomipramine Cocaïne (0,074 µm) Doxorubicine Fluoxétine Halofantrine Indinavir Halopéridol Lévomepromazine Méthadone Mibéfradil Moclobémide Paroxétine (2 µm) Quinidine (0,04 µm) Ranitidine Ritonavir	Diéthyl- dithiocarbamate Disulfiram	Amiodarone Cimétidine Ciprofloxacine Clarithromycine Diéthyl- Dithiocarbamate Érythromycine Fluconazole Fluvoxamine Gestodène ++ Jus de fruits Itraconazole Kétoconazole Nefazodone Norfluoxétine Mibéfradil Ritonavir Troléandomycine Interféron ?

D'après David A. Flockhart, site Internet, URL : http://www.dml.georgetown.edu/depts/pharmacology/davetab.html.

de fixation de ce récepteur dans le promoteur des P-450 3A humains qui a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes d'induction de cette famille d'enzyme. Ce récepteur peut fixer non seulement les stéroïdes, mais également une grande diversité de molécules à visée thérapeutique allant des antibiotiques tels la rifampicine aux glucocorticoïdes (dexaméthasone et apparentés).
Certains cytochromes sont induits par des mécanismes de stabilisation des messagers comme le CYP 2E1. Cependant, le mécanisme le plus détaillé pour le CYP 2E1 est celui de son induction par l'alcool qui met en jeu une stabilisation de la protéine en retardant sa dégradation par les protéases. Enfin, certains médicaments sont susceptibles de protéger les cytochromes P-450 contre leur dégradation, en se maintenant dans le site actif, comme certains macrolides (et leurs métabolites hydroxylés), ce qui peut parfois conduire à une situation où l'enzyme, induite par stabilisation de la protéine, est cependant inactive en raison d'une compétition de substrats à l'intérieur du site, comme c'est le cas pour le CYP 3A4 avec la troléandomycine.

2. Interactions médicamenteuses *(tab. 5)*

Des risques d'interaction surviennent au cours d'associations thérapeutiques. Elles sont causées soit par l'induction qui accélère le métabolisme des produits métabolisés par le CYP qui est induit, soit par inhibition compétitive (deux produits métabolisés par le même CYP), ou non compétitive (un inhibiteur puissant fixé dans le site actif) ou par répression de la synthèse du CYP (cytokines).
Un exemple d'interaction suivi d'effets indésirables a été celui de la terfénadine. Sur 25 cas de torsades de pointes, dues à un surdosage, 11 étaient le résultat d'une interaction métabolique : inhibition de CYP 3A par le kétoconazole ou un antibiotique macrolide.

Tableau 5. Tableaux des médicaments présentant un risque d'interaction médicamenteuse et cytochromes P-450 impliqués

1A2	2C19	2C9	2D6		2E1	3A4,5,7	
Amitriptyline	*Inhibiteurs*	*AINS :*	*β-bloquants :*	Nortriptyline	*Anesthésiques :*	*Macrolides :*	*Anti canaux calciques :*
Caféine	*de la pompe à protons :*	Diclofénac	S-métoprolol	Minaprine	Enflurane	Clarithromycine	Diltiazem
Clomipramine	Lansoprazole	Ibuprofène	Propafénone	Ondansétron	Halothane	Érythromycine	Félodipine
Clozapine	Oméprazole	S-naproxène ⇒ Nor	Timolol	Perhexiline	Isoflurane	(pas 3A5)	Lercanidipine
Clozapine (F)	Pantoprazole	Piroxicam	*Antidépresseurs :*	Phénacétine	Methoxyflurane	*Anti-arythmiques :*	Nifédipine
Cyclobenzaprine	E-3810	Suprofène	Amitriptyline (en partie)	Phenformine	Sevoflurane	Quinidine ⇒ 3-OH	Nisoldipine
(Flexeril®)	*Anti-épileptiques :*	*Hypoglycemiants*	Clomipramine (en	Propranolol (⇒ 4OH)		(pas 3A5)	Nitrendipine
Estradiol	Diazépam ⇒ Nor	*oraux :*	partie)	Quanoxan	Acétaminophène	*Benzodiazépines :*	Vérapamil
Fluvoxamine	Phénytoïne (O)	Tolbutamide	Désipramine	Sparteine	⇒ NAPQI	Alprazolam	*Inhibiteurs HMG CoA :*
Halopéridol	S-méphénytoïne	Glipizide	Imipramine (en partie)	Tramadol	Aniline	Diazépam ⇒ 3OH	Atorvastatine
Imipramine	Amitriptyline (en partie)	*Bloqueurs*	*Antipsychotiques :*	Venlafaxine	Benzène	Midazolam	Cerivastatine
Méxilétine	Citalopram	*de l'angiotensine :*	Halopéridol	Phénacétine	Chlorzoxazone	Triazolam	Lovastatine
Naproxen (en partie)	Clomipramine (en partie)	PAS candesartan	Perphénazine	Phenformine	Éthanol	*Immuno-*	Pas Pravastatine
Ondansétron		Irbésartan	Rispéridone ⇒ 9OH	Propranolol (⇒ 4OH)	N, N-diméthyl	*modulateurs :*	Simvastatine
(en partie)	Cyclophosphamide	Losartan	thioridazine		Formamide	Cyclosporine	*Stéroïde 6bêta-OH :*
Phénacétine ⇒	Hexobarbital	Valsartan			Théophylline	Tacrolimus	Hydrocortisone
Acétaminophène	Imipramine		Alprénolol		⇒ 8-OH	(FK506)	Progestérone
⇒ NAPQI	Indométacine	Phénytoïne ⇒ 4-OH	Amphétamine			*Anti Protéases :*	Testostérone
Propranolol	R-mephobarbital	Sulfaméthoxazole	Bufuralol			Indinavir	*Divers :*
Riluzole	Moclobémide	Tamoxifen	Codéine			Ritonavir	Alfentanil
Tacrine	Nilutamide	Torsémide	(⇒ O-desMe)			Saquinavir	Buspirone
Théophylline	Primidone ?	S-warfarine	Débrisoquine			Prokinetique	Caféine ⇒ TMU
Vérapamil (theo)	Progestérone		Dexfenfluramine			Cisapride	Cocaïne
(R) Warfarine	Proguanil		Dextrométhorphane			*Antihistaminiques :*	Dapsone ⇒ N-OH (en
Zileuton	Propranolol (en partie)		Encaïnide			Astémizole	partie)
	Téniposide		Flécaïnide			Chlorphéniramine	Codéine-N-déméthylation
	R-warfarine ⇒ 8-OH		Fluoxétine			Propranolol ?	Dextrométhorphane
			Fluvoxamine			Salmétérol	Fentanyl
			Lidocaïne (en partie)			Sildénafil	Lidocaïne (en partie)
			Méthoxyamphétamine			Taxol (en partie)	Méthadone
			S-mexillitène			Terfénadine	Odanestron (en partie)
						Trazodone	

D'après David A. Flockhart, site Internet, URL : http://www.dml.georgetown.edu/depts/pharmacology/davetab.html.

En raison de ces risques, les agences réglementaires font obligation à l'industrie pharmaceutique :

- d'identifier les enzymes, en particulier les CYP, impliqués dans le métabolisme d'une nouvelle substance ;
- de donner toutes indications utiles à ce propos dans la notice (*labelling*) destinée aux dictionnaires de thérapeutiques.

3. Exemples de cytochromes P-450 humains

Les CYP sont exprimés dans plusieurs organes. Dans le foie, les pourcentages des différents CYP sont connus : 3A4 : 20-50 %, 2C8/9 : 10-30 %, 2D6 : 5-10 %, 2C19 : 1- 10 %, 1A2 : 1-10 %, auxquels s'ajoutent 2A6, 2E1, 4A.

a) CYP 1A

Ce sont les cytochromes P-450 étudiés depuis le plus longtemps. Cette sous-famille comprend deux gènes inductibles *CYP 1A1* et *1A2*.
CYP 1A1 est essentiellement présent dans les tissus extrahépatiques, tels le poumon, le placenta, les lymphocytes, la peau. Chez les humains, il est inductible par les hydrocarbures polycycliques aromatiques, en particulier par la fumée de cigarette. Cette induction est médiée par un récepteur Ah. Il existe des différences interindividuelles et interspécifiques importantes de ce récepteur (affinité moindre pour la dioxine, dans l'espèce humaine, comparée aux rongeurs). Un allèle rare, associé à l'absence de GSTM1, paraît être déterminant dans certains types de cancer du poumon provoqués par la fumée de cigarette.

b) CYP 1A2

CYP 1A2 est exprimé dans le foie à des taux très variables. Il existe un polymorphisme dans les taux d'ARNm et de protéines. Le substrat caractéristique, qui permet les mesures d'activité chez l'homme, *in vivo*, est la caféine (3-déméthylée). Ce cytochrome est également responsable, en partie de l'oxydation du paracétamol en quinone-imine (le métabolite hépatotoxique). Parmi les toxiques, CYP 1A2 métabolise de nombreux cancérigènes et mutagènes : le 2-aminofluorène, l'aflatoxine B1, des dérivés de pyrolyse du tryptophane, les mutagènes de la fumée de tabac.
Le taux de 1A2 diminue dans certaines pathologies comme la cirrhose hépatique, et dans les pathologies inflammatoires, car les cytokines proinflammatoires répriment ce cytochrome et d'autres.
CYP 1A2 est inductible par des toxiques et des produits alimentaires. La fumée de tabac (induction pulmonaire et placentaire), l'ingestion de viandes ou de poissons grillés (pyrolysats de tryptophane), végétaux de la famille des crucifères contenant des indoles ou des indoles-carbazoles (choux de Bruxelles et brocolis).
Le médicament inducteur le plus connu est l'oméprazole.

c) CYP 2C

La sous-famille CYP 2C contient au moins cinq gènes distincts. Les CYP 2C sont exprimés constitutivement dans le foie, ils paraissent ne pas être sensibles aux inducteurs, cependant, ils présentent de très grandes variations inter-individuelles dans les foies humains. Ils n'ont pas été observés dans les organes extra-hépatiques. La sous-

famille CYP 2C comporte le (ou les) P-450 responsable(s) de l'hydroxylation stéréospécifique en 4' de la S-méphénytoïne. Cette hydroxylation est polymorphique, 2 à 20 % des humains sont dépourvus de la capacité d'hydroxyler la S-méphénytoïne. Il est donc possible que les effets indésirables sévères qui surviennent lors de traitements de longue durée par la méphénytoïne soient le résultat de cette déficience métabolique. Ce polymorphisme dérive de CYP 2C 19.

De nombreux métabolismes de médicaments présentent la même distribution polymorphique que la méphénytoïne, ce sont : l'hydroxylation de l'hexobarbital et du méphébarbital, l'hydroxylation de l'oméprazole, l'oxydation de la chaîne latérale du propranolol, la N-déméthylation de l'imipramine en desméthylimipramine, la N-déméthylation du diazépam, l'oxydation du proguanil (prodrogue) en cycloguanil dont l'effet antipaludéen n'est pas obtenu chez les métaboliseurs non efficaces.

Plusieurs des P-450 2C sont capables de métaboliser le tolbutamide, spécialement 2C8 et 2C9. 2C8 transforme le rétinol en acide rétinoïque, il catalyse également la N-déméthylation de la benzphétamine.

CYP 2C9 est responsable de la 7-hydroxylation de la S-warfarine, c'est-à-dire de l'inactivation de cet anticoagulant chez l'homme. 2C9 ne métabolise pas la S-méphénytoïne.

2C9 et 2C10 semblent impliqués dans l'hydroxylation du tolbutamide et de l'hexobarbital. Ils sont inhibés par le sulfaphénazole et la sulfinpyrazone.

Il existe des anticorps anti- P-450 2C. Chez les patients victimes d'une hépatite auto-immune induite par l'acide tiénilique, les auto-anticorps (LKM2), produits chez les patients, reconnaissent les P-450 2C9 et 2C10. Il est vraisemblable qu'un métabolite intermédiaire de l'acide tiénilique alkyle l'un ou plusieurs des P-450 2C. Le P-450, ainsi modifié et devenu antigénique, serait présenté à la surface de l'hépatocyte, où il est reconnu par le système immunitaire. CYP 2C18, moins bien connu pourrait contribuer à l'hydroxylation de la warfarine et du lansoprazole.

d) CYP 2D

CYP 2D6 est l'exemple le plus documenté du polymorphisme génétique des enzymes d'oxydation. La découverte initiale de ce polymorphisme a été effectuée à propos de l'oxydation de la débrisoquine et de la spartéine. Le polymorphisme de CYP 2D6 est exprimé dans quatre phénotypes : métaboliseurs extensifs, métaboliseurs lents ou limités, métaboliseurs intermédiaires, métaboliseurs ultra-rapides. Ce polymorphisme présente une très grande variabilité interethnique.

Le gène codant a été localisé sur le chromosome 22, accompagné de pseudogènes non fonctionnels. Il existe un nombre élevé d'allèles (plus de 50) porteurs de mutations ponctuelles, de réarrangements de gènes et de pseudogènes, de multiples copies du gène… qui entraînent l'absence, la diminution ou l'augmentation de l'activité.

L'intérêt porté au CYP 2D6 en pharmacologie et en toxicologie tient à ce que de nombreuses études cliniques ont montré que le polymorphisme a des conséquences en thérapeutique (inefficacité ou apparition d'effets indésirables). De plus, des études épidémiologiques tendent à montrer des associations entre risques pathologiques (cancers, maladies neurodégénératives, maladies inflammatoires) et génotypes de 2D6.

CYP 2D6 intervient dans le métabolisme d'un grand nombre de médicaments, et les conséquences du polymorphisme sont variables selon l'index thérapeutique, l'importance de la voie métabolique polymorphe. Pour ces raisons, l'industrie pharmaceutique étudie les effets du polymorphisme de 2D6 sur la cinétique et les effets cliniques des nouvelles molécules, quand elles sont substrats du CYP 2D6.
Des exemples concernent les médicaments du SNC et des antiarythmiques.
L'une des voies de métabolisation de l'imipramine dépend du 2D6 : une accumulation de désipramine se produit chez les sujets métaboliseurs lents qui sont exposés aux effets indésirables concentration-dépendants, au contraire les métaboliseurs extensifs ou ultra-rapides sont exposés à l'inefficacité thérapeutique.
L'effet antalgique de la codéine n'est pas obtenu chez les métaboliseurs limités, car la biotransformation de la codéine en morphine n'est pas effectuée.
Parmi les antiarythmiques, l'exemple de la flécaïne montre les rôles associés de pathologies et de polymorphismes. Les métaboliseurs lents ont une clairance faible du flécaïnide qui est éliminé inchangé chez ces sujets. Si la fonction rénale est correcte, l'excrétion rénale compense le faible métabolisme. Si la fonction rénale est déficiente avec un phénotype métaboliseur lent, une dose thérapeutique conduit à un surdosage et à des effets indésirables : troubles du rythme, torsades de pointe.
À côté de son rôle dans la biotransformation de médicaments, CYP 2D6 est impliqué dans le métabolisme de substances endogènes, de xénobiotiques procarcinogènes et de neurotoxiques. Des associations sont donc décrites entre les génotypes de 2D6 et des pathologies.

e) CYP 2E

La sous-famille 2E est très importante du point de vue toxicologique car elle est inductible par beaucoup de petites molécules organiques, en particulier des solvants. Les substrats comprennent des solvants et des produits cancérigènes et assez peu de médicaments. Les inducteurs sont le pyrazole ou le 4-méthylpyrazole, l'isoniazide, l'éthanol, l'acétone et d'autres cétones, l'isopropanol, la pyridine, le benzène.
CYP 2E est aussi induit par les conditions physiopathologiques qui sont cétogènes (le jeûne, le diabète et l'obésité), c'est ainsi que l'activité enzymatique a pu être détectée dans des leucocytes de patients diabétiques mal équilibrés. En ce qui concerne les produits de l'environnement industriel, des concentrations de solvants susceptibles d'être rencontrées sur les lieux de travail peuvent suffire à provoquer l'induction.
Les informations acquises expérimentalement chez le rat sont très bien corrélées, avec ce qui est connu chez l'homme.
Chez l'homme, 2E1 métabolise la N-nitrosodiméthylamine, l'aniline, l'éthanol, le tétrachlorure de carbone, et parmi les médicaments, des anesthésiques, l'enflurane, l'halothane et leurs analogues, le paracétamol, ainsi qu'un relaxant musculaire, la chlorzoxazone. La mesure de l'hydroxylation de cette dernière est utilisée comme méthode indirecte de mesure, *in vivo*, chez l'homme, de l'activité de l'enzyme.
Parmi les cancérigènes, outre la diméthylnitrosamine, les substrats sont le chloroforme, le chlorure et le bromure de vinyle, les bromures et chlorure d'éthylène, les carbamates de vinyle et d'éthyle, le benzène et le styrène.

Toujours chez l'homme, les inhibiteurs caractéristiques sont le disulfiram et le méthoxypsoralène.
Dans une population japonaise, un polymorphisme de la région 5' en amont du gène a été observé. Cette région a une fonction de régulation du gène. C'est pourquoi l'étude de cette région pourrait permettre de comprendre les très grandes variations interindividuelles de l'activité de CYP 2E1 dans les microsomes de foies humains.
Un allèle CYP 2E1*6 qui conduit à une forte activité paraît déterminant dans le risque de cancer du nasopharynx.

f) CYP 3A

Cette famille est particulièrement importante pour le métabolisme de substrats endogènes (stéroïdes) et pour celui de très nombreux médicaments.
Chez l'homme, cette famille est composée d'au moins quatre gènes, CYP 3A3, 3A4, 3A5 qui sont les formes exprimées chez l'adulte et CYP 3A7, une forme exprimée chez le fœtus. Le premier des P-450 humains qui ait été purifié et dénommé HLp (*human liver*) ou NF (nifédipine) est le P-450 3A4, car il est le plus abondant dans le foie humain adulte (plus de 50 %). Les biotransformations de substrats physiologiques dues aux cytochromes P-450 de famille 3A sont la 6-bêtahydroxylation de la testostérone, de la progestérone, du cortisol et de l'androstène dione, la 2- et la 4-hydroxylation de l'estradiol, la 16-alpha hydroxylation du DHEA-3-sulfate.
Les médicaments métabolisés par 3A4 et 3A5 sont nombreux. En raison de ce grand nombre, les inhibitions compétitives ne sont pas rares, elles ont été étudiées surtout pour connaître les interactions médicamenteuses à risque, lors de traitements par la ciclosporine ou lors de traitements par la nifédipine.
Parmi les toxiques figurent essentiellement l'aflatoxine B1 et un alcaloïde de structure pyrrolizidine du séneçon, la sénécionine.
Les P-450 3A sont fortement inductibles, spécialement par des médicaments. L'induction du métabolisme de la ciclosporine par la rifampicine ou par la dexaméthasone est telle que la concentration de ciclosporine s'effondre, ce qui fait courir un risque de rejet de greffe. D'autre part, l'augmentation du métabolisme des stéroïdes naturels ou synthétiques, lors des traitements par des barbituriques, est connue depuis longtemps, avec la conséquence d'échec des contraceptions orales par de faibles doses de stéroïdes.
Plusieurs inhibiteurs sont connus : le TAO qui forme un intermédiaire réactif, lequel réagit dans le site actif de l'enzyme, pour former un complexe. Un autre exemple est un stéroïde 17-alpha-acétylénique, contraceptif le gestodène, qui détruit ce P-450 par lequel il est métabolisé. Enfin, des flavonoïdes du pamplemousse, qui sont présents dans le jus de fruit, la naringénine, la quercétine et le kaempferol sont capables d'entrer en compétition avec le métabolisme de la nifédipine. La cimétidine est également un inhibiteur efficace, ainsi que les antifongiques de structure imidazole : kétoconazole, miconazole, chlotrimazole. En thérapeutique, on sait depuis longtemps que la cimétidine augmente la concentration des anticoagulants de la famille de la warfarine.
Plusieurs méthodes *in vivo* chez l'homme, sont employées pour estimer l'activité 3A4.

Le recours à un substrat physiologique, le cortisol, qui est transformé pour 1 ou 2 % en 6-bêta-hydroxycortisol, éliminé dans l'urine, permet de n'administrer aucune substance étrangère et de disposer d'un test réellement non invasif, utile pour le suivi des inductions de 3A4. Parmi les médicaments, plusieurs produits sont utilisés : la nifédipine, l'érythromycine, la lidocaïne :

- la nifédipine est le prototype des dihydropyridines anticalciques et substrat de 3A4. L'administration d'une dose de 10 mg suffit à l'étude pharmacocinétique qui suppose plusieurs prélèvements sanguins. L'induction par les barbituriques (pentobarbital) et les inhibitions par le jus de pamplemousse d'une part, et par la cimétidine d'autre part sont très nettes. Les limites sont dans le fait que le produit a des effets cardiovasculaires même à faible dose et que plusieurs prélèvements sanguins sont nécessaires ;
- l'érythromycine est un substrat de 3A4. Il a été proposé aux USA d'administrer de la N-(14C)méthylérythromycine et de mesurer le CO_2 marqué éliminé par voie respiratoire lors de la déméthylation de l'érythromycine. L'inductibilité par la dexaméthasone et par la rifampicine est observée. La limite réside dans l'utilisation du produit marqué ;
- la lidocaïne, un anesthésique local et antiarythmique, est N-déméthylée par le 3A4 en MEGX (monoéthylglycinexylidide). L'efficacité de cette biotransformation est utilisée pour tester les qualités métaboliques des foies transplantés, dans le but de prévoir les doses de ciclosporine qui devront être administrées au receveur.

L'importance de ces cytochromes P-450 3A tient à :

- l'inductibilité ;
- l'abondance dans le foie humain ;
- le très grand nombre de médicaments métabolisés ;
- et donc, les risques d'interaction médicamenteuse.

E. Autres réactions de phase I

1. Oxydation des alcools et des aldéhydes

Les alcools et les aldéhydes déshydrogénases se trouvent principalement dans le foie, ce sont des enzymes mitochondriales et cytosoliques. Elles utilisent NAD^+ comme cofacteur (voir le chapitre Toxicologie de l'éthanol).

Il existe des variations génétiques des alcools déshydrogénases. (ADH). Trois gènes *ADH* codent pour des sous unités alpha, bêta 1, -2, -3, gamma 1,-2. L'ADH étant un dimère, il y a 21 possibilités d'ADH humaines. La sous unité bêta 2 « atypique » est particulièrement fréquente en Asie.

Il existe actuellement 10 gènes connus, codants pour les aldéhydes déshydrogénases. Une ALDH est composée de 4 sous unités, et il suffit que l'une d'entre elle soit déficiente pour que l'enzyme soit inactive. On connaît l'importance de la déficience ALDH2 qui est transmise de manière autosomale, dominante, et qui est à l'origine du syndrome de flush, dû à la toxicité de l'aldéhyde produit à partir de l'alcool et non métabolisé en acide. Cette déficience est fréquente (45 %) dans la population du Sud-Est asiatique.

$$R1-\underset{R2}{\overset{H}{C}}-OH \xrightleftharpoons{NAD^+} R1-\underset{\underset{(H)}{R2}}{C}=O \xrightarrow{NAD^+} R1-\underset{OH}{C}=O$$

2. Les hydrolases

Les esters, les amides, les hydrazides et les carbamates sont hydrolysés par différents enzymes.
L'hydrolyse des esters peut avoir lieu dans le plasma (acétylcholinestérase non spécifique, pseudocholinestérases et autres estérases) ou dans le foie (estérases spécifiques).
L'hydrolyse des amides est effectuée par les estérases plasmatiques.
En résumé, les réactions de phase I introduisent ou mettent au jour un groupement fonctionnel qui prépare la substance à être métabolisée par les enzymes de phase II, mais elles ne le préparent pas à l'excrétion immédiate.

R1—O—CO—R2 → R—OH + HOOC—R2
Ester

R1—CO—NH—R2 → R—COOH + H2N—R2
Amide

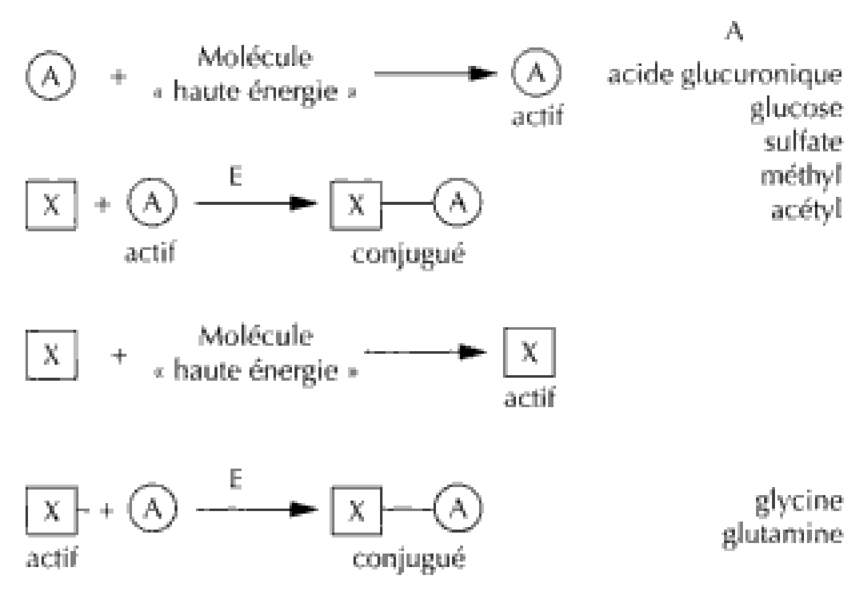
R1—CO—NH—NH(R2) → R1—CO—N=N(R2) → R1—NH—NH2 + HOOC—R2
Hydrazide

R1—NH—COO—CH2—CH2—$N(R2)_2$ → R1—NH2 + HOOC—CH2—CH2—$N(R2)_2$
Carbamate

La paraoxonase hydrolyse les métabolites toxiques des organophosphorés (paraoxon, diazoxon). C'est aussi une protéine associée aux HDL, dont le rôle physiologique serait l'élimination des produits de lipides oxydés.

III. Les réactions de phase II

Les réactions de phase II ou de conjugaison sont des réactions de synthèse qui conduisent généralement à un produit hydrosoluble, peu ou pas actif, éliminé dans l'urine ou dans la bile. Elles sont généralement classées en fonction du cofacteur nécessaire et de son état d'activation. En effet, de l'énergie est nécessaire pour toute réaction de phase II. Tous les cofacteurs ou accepteurs ont un poids moléculaire relativement élevé, ils sont tous très hydrophiles. Ils sont en nombre relativement limité.



X : xénobiotique ; A : accepteur ; E : transférase.

A. Glucuronoconjugaison *(tab. 6)*

La conjugaison à l'acide glucuronique, à partir de l'acide UDP-glucuronique, est réalisée par des enzymes, les UDP glucuronosyltransférases (EC 2.4.1.17) qui appartiennent à la superfamille des UDP glycosyltransférases (UGTs).
L'acide UDP glucuronique est formé dans le cytoplasme de la cellule, à partir de glucose-1-phosphate. La conjugaison d'une aglycone avec l'acide glucuronique implique une attaque nucléophile sur l'atome de carbone C1 de l'acide glucuronique, de sorte que les glucuronides obtenus sont de configuration bêta.

Tableau 6. Fonctions chimiques pouvant être glucuronoconjuguées

Type de glucuronide	Fonctions	Composés	Exemples
O-glucuronides	$R-C_6H_4-O-H$	Phénol	Phénol Morphine Paracétamol
	$-C-O-H$	Alcool Énol	t-butanol Stéroïdes Chloramphénicol 3,5-endrostérone-3-17-dione
	$-C(=O)-O-H$	Acide carboxylique	Bilirubine Acide valproïque AINS
	$>N-O-H$	Hydroxylamine Acide hydroxamique	N-hydroxy-2-naphtylamine N-hydroxy-2-acétylaminofluorène

.../...

Type de glucuronide	Fonctions	Composés	Exemples
S-glucuronides	R–C₆H₄–S–H (flèche sur H)	Thiophénol	Thiophénol
	–C–S–H	Thiol	2-mercapto-benzothiazole
	–C(=S)–S–H	Acide carbamique	Acide diéthyldithiocarbamique
N-glucuronides	>N–H	Amine aromatique hydroxylamine	Aniline N-hydroxy-2-napthylamine
	C–N(–C)–C	Amine tertiaire	Cyproheptadine
	H–N–C(=O (ou S))–N–H, H	Carbamate Thiocarbamate	Carbamate Thiocarbamate
	–S(=O)(=O)–N(H)–H	Sulfonamide	Sulfonamide
C-glucuronides	–C(=O)–CH–H–C(=O)–	1,3-dicarbonyle	Sulfinpyrazone Phénylbutazone

Chez les mammifères, les UDP glucuronosyltransférases sont des enzymes membranaires ancrées dans le réticulum endoplasmique. Leur localisation est principalement hépatique, mais également intestinale, rénale, dermique, muqueuse (nasale) et cérébrale.

Elles catalysent la glucuronoconjugaison de substrats endogènes, parmi lesquels la bilirubine, les acides biliaires, les stéroïdes, la thyroxine, les amines biogènes, des vitamines liposolubles. Des milliers de xénobiotiques, alcools aliphatiques ou aro-

matiques, phénols, acides carboxyliques, composés soufrés et amines, sont éliminés sous forme de glucuronides, tels que des hydrocarbures polycycliques aromatiques, des cancérogènes, des terpènes, et de très nombreux médicaments ou leurs métabolites de phase I.

Il existe une multiplicité d'isoformes, de spécificité variable, qui sont désignées par une nomenclature qui suit les recommandations de *Human Gene Nomenclature Guidelines*.

La famille *UGT1* comporte les enzymes qui conjuguent la bilirubine, les quinones (après réduction en quinols) et les phénols, y compris ceux qui proviennent des biotransformations des hydrocarbures polycycliques. La famille *UGT2A* comprend au moins un gène spécifique de la muqueuse nasale. La famille *UGT2B* contient les gènes inductibles par le phénobarbital et ceux impliqués dans la conjugaison des stéroïdes et des amines biogènes.

Il existe un certain nombre d'inducteurs plus ou moins spécifiques de certaines UDPGTs : le phénobarbital, la dioxine et d'autres hydrocarbures polycycliques, les proliférateurs de peroxysomes, la rifampicine, les stéroïdes contraceptifs et la carbamazépine.

La glucuronoconjugaison est essentiellement une réaction de détoxification, les glucuronides formés étant généralement stables et inactifs. Exception faite du glucuronide -6- morphine dont l'activité antalgique est très élevée, les glucuronides sont généralement dénués d'activité pharmacologique. Cependant, la formation de glucuronides instables ou réactifs, à partir d'acides carboxyliques, est à l'origine d'effets indésirables comme des chocs anaphylactiques provoqués par des AINS dont les acylglucuronides forment des adduits sur les protéines. Un autre exemple de glucuronide toxique est celui du glucuronide de N-hydroxy-acétyl aminofluorène qui est cancérigène.

Le dérivé 5'-glucuronoconjugué est le principal métabolite de l'AZT (50 à 80 % de la dose administrée), cette conjugaison importante et rapide contribue à la courte demi-vie de ce médicament et au risque d'interactions médicamenteuses par induction ou inhibition de la glucuronoconjugaison.

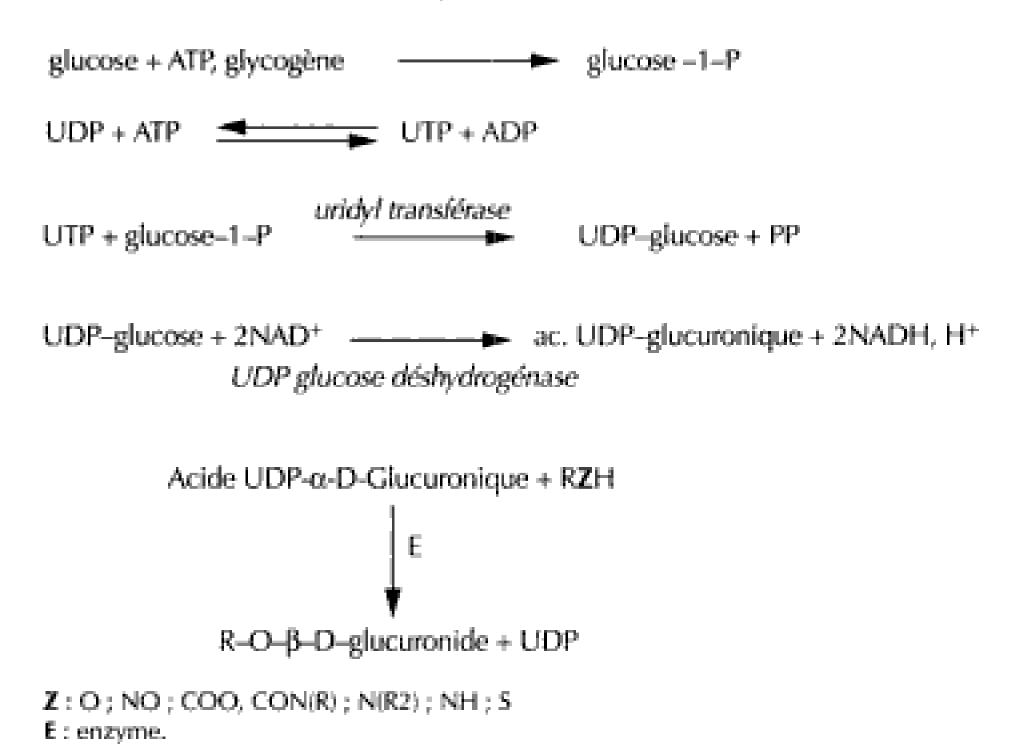
Certains glucuronides subissent une hydrolyse par la bêta-glucuronidase. S'il s'agit d'un glucuronide excrété par voie biliaire, la substance libérée dans l'intestin peut être réabsorbée et revenir au foie, ce qui constitue un cycle entérohépatique.

L'UGT1 A1 catalyse la glucuronoconjugaison de la bilirubine. De nombreuses mutations de cette enzyme (30 allèles décrits en 1997) sont causes d'hyperbilirubinémies discrètes (Syndrome de Gilbert) ou sévères et parfois létales dès l'enfance (maladie de Crigler-Najjar) en raison de l'inactivité de l'enzyme pour conjuguer la bilirubine. Cependant, les ictères néonataux très fréquents ne sont pas le signe d'une déficience génétique, mais simplement de l'immaturité de l'enzyme dans la période néonatale. Les médicaments fortement glucuronoconjugués doivent être utilisés avec des posologies adaptées ou sont contre-indiqués chez l'enfant de moins de 2 ans.

L'intérêt du processus de glucuronoconjugaison tient sans doute à plusieurs facteurs :

- la facilité d'obtenir des glucides comme agent de conjugaison ;
- la forte polarité du groupement carboxylique de l'acide glucuronique qui facilite l'élimination des glucuronides ;

- le fait que les glucuronides sont presque toujours moins toxiques et plus solubles que le composé parent ;
- les innombrables aglycones conjugables.



B. Sulfoconjugaison *(tab. 7)*

Le transfert d'un groupement sulfonate du donneur 3'-phosphoadénosine 5'phosphosulfate (PAPS) à un accepteur est catalysé par une famille d'enzymes : les sulfotransférases (STs) (EC 2.8.2.12).

Tableau 7. Substrats des sulfotransférases humaines

hM-PST	hP-PST	hEST	hHST
Dopamine	4-nitrophénol	β-estradiol	Déhydroépiandrostérone
Adrénaline	Phénol	Estrone	Androstérone
Vaniline	α-naphthol	Déhydroépiandrostérone	Testostérone
5-hydroxytryptamine	Minoxidil	Prégnénolone	β-estradiol
α-naphthol	Paracétamol	17α-éthinylestradiol	Prégnénolone
Paracétamol	Triiodothyronine	α-naphthol	Acide lithocholique
Triiodothyronine			Cholestérol

Le PAPS est synthétisé à partir du sulfate endogène. Le sulfate minéral est essentiel pour cette synthèse. Le pool de sulfate est réapprovisionné par sulfoxydation des acides aminés soufrés, par absorption intestinale ou réabsorption rénale du sulfate minéral, par dégradation de macromolécules soufrées et par l'activité des sulfatases. C'est pourquoi la sulfoconjugaison peut être limitée lors de déficiences protéiques ou d'alimentation pauvre en sulfate par exemple.

Les sulfotransférases dont il est question dans ce chapitre sont des enzymes cytosoliques qui sont surtout des dimères, homo ou hétérodimères. Elles sont présentes dans différents tissus, au premier rang desquels se trouvent le foie, l'intestin, le rein, le cerveau, les thrombocytes.
Les substrats accepteurs principaux sont les hydroxyles aromatiques ou aliphatiques. Cependant les STs sont aussi capables de conjuguer d'autres substrats : amines primaires, N-oxydes, hydroxylamines.
La sulfoconjugaison est aussi impliquée dans le métabolisme de substrats endogènes dont les stéroïdes (estrogènes et autres stéroïdes phénoliques, ainsi que des hydroxystéroides non phénoliques comme la DHEA), les acides biliaires, les neurotransmetteurs monoamines phénoliques (dopamine, norépinéphrine) et les hormones thyroïdiennes.
Alors que la sulfoconjugaison est traditionnellement considérée comme une voie de détoxication, les sulfotransférases sont impliquées dans la bioactivation de certains mutagènes parmi lesquels des alcools benzyliques dérivés des hydrocarbures polycycliques et des hydroxylamines aromatiques. À titre d'exemple, on peut citer le N- hydroxyaminofluorène, le 1'-hydroxysafrole et l'alphahydroxytamoxifène.
La sulfoconjugaison permet aussi d'activer des prodrogues : l'exemple est le minoxidil qui est actif sous la forme sulfate.
Les sulfotransférases sont une superfamille de gènes qui comporte les phénolsulfotransférases (PST), les hydroxystéroides sulfotransférases (HSST), et chez les plantes, les flavonolsulfotransférases (FST).
Dans l'espèce humaine, il y a actuellement 5 sulfotransférases cytosoliques connues : une estrogène ST (hEST), une HSST (hDHEAST) et 3 PSTs (h TSPST1, hTSPST2, hTLPST). TS et TL désignent respectivement des formes thermosensibles et thermolabiles présentes dans les plaquettes sanguines.
Les sulfotransférases sont considérées comme réfractaires aux inducteurs classiques. Leur régulation est très sensible à des facteurs endogènes : androgènes, hormones de croissance, diabète, glucocorticoïdes.
Il existe des polymorphismes génétiques qui contrôlent les variations inter-individuelles et peuvent expliquer des différences de toxicité et d'activité thérapeutique. Ces polymorphismes ont été démontrés pour hTS PST dans les thrombocytes, le cerveau, l'intestin grêle et le foie humains. L'existence de polymorphismes est également probable pour les autres PST : hTLPST, hDHEAST, hEST.
Pour un même substrat, l'équilibre entre glucurono et sulfoconjugaison se fait en fonction de la disponibilité limitante du sulfate minéral, de la dose du toxique (à faible dose c'est la sulfoconjugaison qui prime sur la glucuronoconjugaison, à forte dose c'est l'inverse), de l'organe, et de l'espèce animale.
Enfin les sulfoconjugués peuvent être hydrolysés par des sulfatases.

$$ATP + SO_4^{2-} \longrightarrow \text{adénosine-5'-phosphosulfate} + PP \text{ (APS)}$$

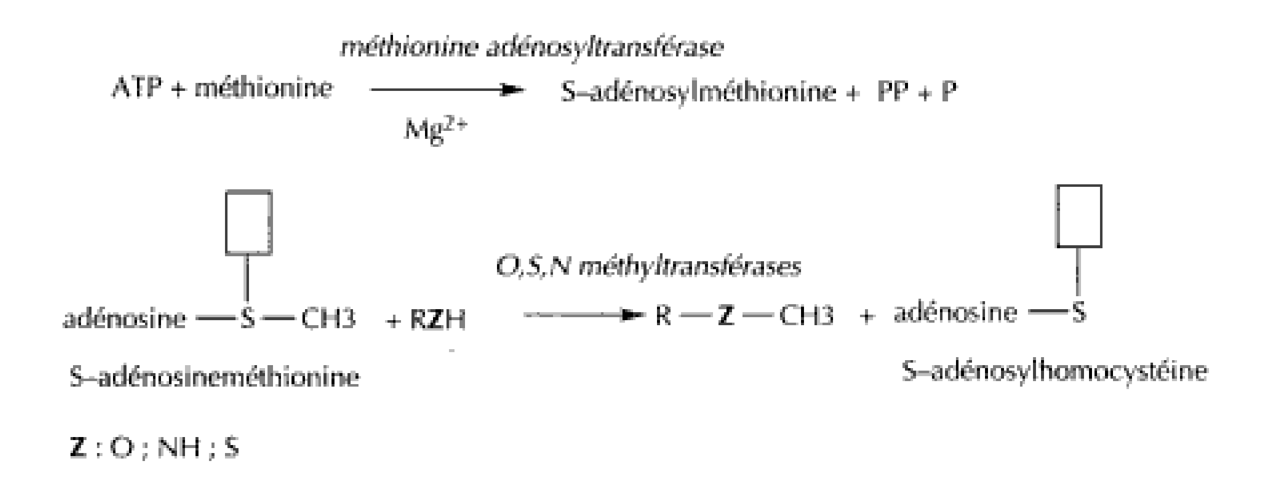
$$APS + ATP \longrightarrow \text{3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate} + ADP \text{ (PAPS)}$$

$$PAPS + R\text{-}OH \xrightarrow[\textit{sulfotransférase}]{} R\text{-}O\text{-}SO_3 + PAP$$

C. Méthylation

Les méthylations s'effectuent sur des groupements amino, hydroxyl ou thiol par l'intermédiaire de méthyltransférases qui requièrent la S-adénosyl-méthionine. Celle-ci est formée par réaction de la méthionine avec l'ATP.
Ces enzymes sont surtout cytosoliques, quelques-unes sont microsomales :

- la thiopurine méthyltransférase (TPMT) est une enzyme cytosolique qui conjugue des groupements SH avec le méthyl de la S-adénosineméthionine. L'importance tient dans un polymorphisme génétique, qui se présente sous 3 phénotypes : rapide, intermédiaire et faible. Ce polymorphisme est très important pour le suivi des patients qui reçoivent de la mercaptopurine dans le traitement de leucémies. Les homozygotes rapides (13 % des patients) métabolisent le médicament trop rapidement, avec comme conséquence des rechutes. Les hétérozygotes rapides/faibles (87 %) bénéficient d'une bonne efficacité thérapeutique. Les homozygotes faibles (1 sur 300) ne peuvent pas métaboliser cet antipurique et décèdent en raison de la toxicité du traitement. Il est donc recommandé de génotyper les patients avant traitement pour adapter la dose ;
- la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (EC 2.1.1.6.) inactive par méthylation des neurotransmetteurs, des hormones, et des xénobiotiques ou médicaments contenant un catéchol, tels que la lévodopa. Il a été proposé d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la lévodopa chez les malades parkinsoniens en administrant des inhibiteurs de COMT.



D. Acétylation

L'acétylation est sous la dépendance des arylamines N-acétyltransférases (NATs) (EC 2.3.1.5.), dont le coenzyme est l'acétyl coenzyme A. Celui-ci nécessite pour sa synthèse de l'ATP qui sera régénéré. Les acétyltransférases sont des enzymes cytosoliques. Le gène NAT1 est exprimé dans de nombreux tissus, NAT2 l'est essentiellement dans le foie et l'intestin.
Les NATs transfèrent un groupement acétyl sur des amines aromatiques ou aliphatiques primaires, des hydrazines, des hydrazides, des sulfonamides et participent globalement à la détoxication. La réaction enzymatique se déroule selon un processus en deux étapes, appelé encore mécanisme ping-pong bi-bi. Dans un premier temps, la réaction de l'enzyme avec le donneur d'acétyl conduit à la formation

d'une enzyme acétylée intermédiaire stable. Puis, dans un deuxième temps, l'enzyme acétylée est saponifiée par une amine avec régénération de l'enzyme libre et formation du substrat acétylé.
Chez l'homme, les NATs font partie des exemples les plus anciens et les mieux connus de polymorphismes génétiques.
Le polymorphisme de NAT2 (une quinzaine de variants alléliques) se traduit par l'expression de phénotypes dits « acétyleurs lents » et « acétyleurs rapides ». De très grandes variations interethniques dans la fréquence des acétyleurs lents sont décrites. Les conséquences cliniques et pharmacologiques du polymorphisme de la NAT2 sont importantes. Ce polymorphisme est à l'origine de la survenue d'effets indésirables ou toxiques lors de l'administration de certains médicaments. Il est impliqué aussi dans la variabilité interindividuelle de la bioactivation ou de la détoxication de différents mutagènes ou procarcinogènes. Par exemple, les acétyleurs lents traités par l'isoniazide peuvent être victimes de neuropathies périphériques. Le phénotype lent a également été corrélé avec des réactions d'hypersensibilité aux sulfamides. Chez les acétyleurs rapides, les effets sont plutôt l'insuffisance thérapeutique.
De plus, puisque les N-acétyltransférases activent des amines cycliques et hétérocycliques, les métabolites toxiques peuvent se fixer aux macromolécules et participer au risque de cancérisation.
L'existence d'une seconde arylamine N-acétyltransférase, NAT1 a été démontrée chez l'homme, ce polymorphisme, encore mal connu, est indépendant du polymorphisme de NAT2.
Enfin, les métabolites acétylés solubles sont éliminés par voie urinaire. Toutefois certains dérivés acétylés, moins solubles que le produit d'origine, peuvent précipiter dans les voies urinaires.
En résumé, l'importance des NATs tient dans le polymorphisme génétique, avec de fortes variations interethniques. Ce polymorphisme a des conséquences importantes en matière d'effets indésirables de médicaments et de susceptibilité à diverses pathologies.

CH3COOH + ATP + COA—SH ⟶ CH3—CO—S—CoA + AMP + PP

CH3—CO—S—CoA + R—NH2 ⟶ R—NH—COCH3 + CoA—SH

Acétyl-coenzyme A *N-acétyltransférase* Amide

Tableau 8. Polymorphisme NAT2 et réactions indésirables aux médicaments

Médicament	Acétyleurs lents	Acétyleurs rapides
Isoniazide	Neuropathies	Insuff. Thérapeutique
Sulfamides	Hypersensibilité	
Hydralazine	Lupus Érythémateux	Insuff. Thérapeutique
Procaïnamide	Lupus Érythémateux	
Sulfasalazine et sulfapyridine	Vomissements, Anémie	
Amonafide		Leucopénie

Tableau 9. Polymorphisme NAT2 et pathologies non iatrogènes

Acétyleurs lents		Acétyleurs rapides
Cancers	Vessie Foie Mésothéliome Sein ?	Cancer Côlo-rectal ? Poumon ?
Syndrome de Gilbert		
Hyperthyroïdie		
Maladie Périodique		
Allergies		
Lèpre		

Tableau 10. Polymorphisme NAT2 dans les populations humaines

	Fréquence des acétyleurs lents
« Caucasiens »	
Europe-Amérique du Nord	52 %
Afrique du Nord	80-90 %
« ASIATIQUES »	
Chine, Japon	10-20 %
Esquimaux	5 %

E. Conjugaison aux acides aminés

Ce n'est pas le donneur, mais le substrat qui est activé.
Comme pour l'acétylation l'énergie est fournie par du CoA qui sera restitué. La perte porte sur un acide aminé qui sera excrété sous forme conjuguée. L'acide aminé principalement mis en jeu est la glycine, et dans une moindre mesure la glutamine. La disponibilité en glycine peut être limitée spécialement dans les déficiences protéiques sévères, chez les nouveau-nés ou chez les sujets âgés. Les acides carboxyliques sont des substrats de cette conjugaison.
L'équilibre avec la glucuronoconjugaison des acides carboxyliques se fait en fonction du poids moléculaire et de l'encombrement de la molécule. Chez l'homme, l'exemple historique de conjugaison à la glycine est celle de l'acide benzoïque. Le conjugué, découvert par Keller en 1842, reçut le nom d'acide hippurique, car il avait été découvert dans l'urine d'un cheval.
Cette conjugaison s'effectue dans le foie et le rein, dans les fractions mitochondriales et cytoplasmiques.

R—COOH + ATP ⟶ RCO—AMP + PP
(par ex. : ac. benzoïque)

RCO—AMP + CoA—SH ⟶ RCO—S—CoA + AMP

N-acyltransférase
RCO—S—CoA + H2N—CH2—COOH ⟶ R—CO—NH—CH2—COOH + CoA—SH
Glycine — (par ex. : acide hippurique)

F. Conjugaison au glutathion

Les réactions de conjugaison au glutathion sont catalysées par des glutathions transférases (GSTs) qui sont une famille d'enzymes, réparties en 7 classes : alpha (A), mu (M), pi (P), sigma (S), thêta (T), kappa (K) et zêta (Z) Les GSTs se trouvent principalement dans le cytoplasme, quelques-unes ont une localisation microsomale. Toutes les glutathions transférases cytosoliques sont des dimères de sous unités, sous forme d'homo ou d'hétérodimères à l'intérieur d'une même classe. Les GSTs présentent une large spécificité de substrat. Les principaux substrats sont électrophiles, ce sont des hydrocarbures, des alkyl ou des aryl hydrocarbures halogénés, des époxydes, des composés nitroaromatiques ou des alcènes. Certaines des réactions que catalysent les GSTs peuvent se produire à vitesse limitée en l'absence d'enzyme, le caractère nucléophile du glutathion suffisant à sa réaction avec les substrats électrophiles.

Les exemples de composés électrophiles sont nombreux. Des carcinogènes sont des substrats des GSTs humaines, notamment les époxydes d'aflatoxine B1 (hGSTM1), le benzopyrène-4,5 oxyde (hGSTM1 et P1), ou encore un dérivé N-acétoxy formé après cuisson de protéines alimentaires et oxydation par des cytochromes P-450.

Les GSTs peuvent détoxifier des pesticides tels que l'atrazine, le DDT, le lindane.

Les GSTs catalysent la conjugaison du glutathion avec de nombreux médicaments anticancéreux : moutardes à l'azote (melphalan, chlorambucil, chlorméthine cyclophosphamide), plusieurs autres agents alkylants sont aussi des substrats des GSTs dont le busulfan.

Les GSTs catalysent également des réactions de bioactivation, conduisant à une toxicité cellulaire, ainsi l'activation du dichlorométhane est catalysée par la GSTT1, qui active aussi des composés mutagènes.

Outre la formation de la liaison thioether entre le glutathion et un composé électrophile, les GSTs peuvent également catalyser la réduction d'hydroperoxydes organiques (par exemple, les hydroperoxydes d'acides gras libres) en alcools correspondants, ce qui est une activité peroxydase. Les hydroperoxydes d'ADN sont également des substrats.

Si la majorité des substrats connus des GSTs sont des xénobiotiques, un petit nombre de molécules endogènes telles que le leucotriène A4 et la prostaglandine H2 sont également métabolisés par les GST.

Les glutathions conjugués peuvent être éliminés par voie biliaire. Ils peuvent aussi subir une coupure enzymatique et une acétylation pour former des conjugués à la N- acétylcystéine, également nommés « acides mercapturiques », qui sont éliminés par voie urinaire. Ces produits sont le résultat d'une conjugaison initiale au glutathion, suivie d'un clivage métabolique des résidus glutamyl (par la gamma glutamyltransférase) et glycinyl (par la cystéinyl glycinase), puis d'une acétylation du reste cystéinyl (par une N-acétyltransférase.)

En dehors des propriétés catalytiques précédemment signalées, les GSTs sont capables de lier des substances hydrophobes. L'une des GST avait ainsi reçu le nom de ligandine, en raison de la liaison réversible de la bilirubine. Si le toxique est suffisamment électrophile, la liaison à l'enzyme peut être irréversible, covalente et aboutir à l'inactivation de l'enzyme.

Les GSTs sont inductibles, le phénobarbital et le méthylcholanthrène augmentent les GSTs de classe alpha humaines. Chez le rat et la souris, de nombreux autres inducteurs ont été décrits.

Plusieurs GSTs présentent un polymorphisme génétique chez l'homme.
Trois types d'allèles existent pour le locus hGSTM1. Le génotype nul est plus fréquent chez les patients atteints de certains cancers (vessie, colon, peau, estomac, poumon). Il existe aussi un polymorphisme de la hGSTT1 ainsi que de la hGSTP1, que divers travaux tentent de mettre en relation avec le risque de survenue de cancers.
Il faut retenir l'importance de la conjugaison au glutathion pour détoxifier les électrophiles.

R — X + Gly — Cys — Glu (Glutathion) —*glutathion S-transférase*→ R — S — CH_2 — CH(CO — gly)(NH — glu)

↓ *γGT*

R — S — CH_2 — CH(CO — gly)(NH_2)

—*« peptidase »*→ R — S — CH_2 — CH(COOH)(NH_2)

↓ acétyltransférase

R — S — CH_2 — CH(COOH)(NH — CO — CH_3)

Acide mercapturique

R : hydrocarbures aromatiques
hydrocarbures halogénés
hydrocarbures nitrés
amines aromatiques
époxydes
sulfonamides

G. Métabolisme des époxydes, les époxydes hydrolases

Les époxydes sont formés au cours de réactions de phase I (voir précédemment).
Les époxydes sont électrophiles et l'époxyde hydrolase (qui est dénommée aussi époxyde hydratase) catalyse l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur l'un des deux atomes de carbone (déficient en électron).
La réaction conduit de préférence à un trans-diol avec des exceptions à cette stéréo-spécificité.
Les époxydes hydrolases se trouvent dans tout le règne animal. Les organes les plus riches sont le foie, le testicule, le rein, les poumons. Dans le foie, la zone la plus riche est, comme pour les cytochromes P-450, les hépatocytes de la zone centrolobulaire.
Il existe au moins trois isoenzymes : une isoenzyme de réticulum endoplasmique (mEH) qui catabolise des époxydes d'hydrocarbures et de stéroïdes ; une isoenzyme du réticulum endoplasmique (ch EH) qui métabolise les époxydes de cholestérol ; une isoenzyme cytosolique (c EH). Leurs masses moléculaires à toutes sont comprises entre 48 000 et 54 000 Da. Elles sont en général inductibles. Elles sont aussi tenues pour être un antigène prénéoplasique.
L'importance de la mEH tient au fait qu'elle est ubiquitaire et possède une large spécificité de substrat. Si le premier rôle de mEH est la détoxification des époxydes

formés par les cytochromes P-450, mEH est aussi impliquée dans la formation de composés très toxiques, comme les dihydrodiols époxydes produits à partir du benzopyrène.
Il y a un seul gène fonctionnel de mEH, il est porteur de sites polymorphiques, et des différences d'expression de mEH peuvent donc prédisposer certaines personnes à la toxicité des époxydes.
Un risque élevé de cancer ovarien a été décrit chez des femmes homozygotes pour un allèle de forte activité (HYL1*1 ou Tyr113 mEH). Il existe aussi une association entre la présence du variant His113 et l'incidence de carcinome hépatocellulaire.
Chez des sujets porteurs de variants de faible activité, la déficience de détoxication de l'arène-époxyde de phénytoïne est cause d'hépatotoxicité, de réactions d'hypersensibilité ou de toxicité fœtale.

H. Formation des thiocyanates

Cette formation élimine des traces de cyanure, grâce à l'intervention de la rhodanèse qui forme du thiocyanate à partir du cyanure (CN^-) et de thiosulfate.

($S_2O_3^{2-}$).

Ce dernier provient du sulfate organique.
L'importance de cette réaction est toutefois très faible, bien que le thiocyanate soit 200 fois moins toxique que le cyanure.
L'enzyme est mitochondriale.

$$CN^- + S_2O_3^{2-} \rightarrow SCN^- + SO_3^{2-}.$$

L'essentiel de la question

Pour conclure, il faut insister sur plusieurs faits :

- les deux phases du métabolisme ne peuvent être considérées isolément, elles fonctionnent en général de façon séquentielle. De plus, un même toxique peut être métabolisé par plusieurs voies ;
- les réactions de phase I sont souvent cause de production de métabolites intermédiaires toxiques (des exemples se trouvent dans le chapitre de monographies tels que le paracétamol, les hydrocarbures polycycliques carcinogènes, les solvants chlorés) ;
- les réactions de la phase II conduisent le plus généralement à l'élimination des médicaments et des toxiques. Les métabolites se trouvent dans les urines ou les fécès où ils peuvent être recherchés. Ces recherches s'effectuent avec ou sans hydrolyse des métabolites ;
- la régulation des enzymes, notamment par induction ou inhibition, peut également être un facteur de toxicité.

Remerciements :

La mise à jour de ce chapitre a bénéficié de données issues de revues, de thèses et de cours de DEA. Les remerciements des auteurs vont en particulier aux doctorants et aux collègues auteurs de ces synthèses : N. Sabbagh et F. Broly (CYP 2D6), K. Mahéo et A. Guillouzo (GSTs), V. Cano (UGTs), R. Landsiedel (STs), C. Déloménie (NATs), J.-P. Thénot (l'industrie pharmaceutique).

C. Armand-Malaplate, pharmacien interne, a effectué une lecture critique.

Mécanismes et manifestations de l'action toxique au niveau hépatique

A. JACQUESON, Laboratoire de Toxicologie, UFR de Médecine
et de Pharmacie, Besançon.
A. PIRIOU, Laboratoire de Toxicologie, UFR de Médecine
et de Pharmacie, Poitiers.
L. VERNHET, Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Rennes.

La grande susceptibilité du foie aux xénobiotiques, particulièrement les médicaments, est la conséquence de sa disposition anatomique et du rôle prépondérant qu'il exerce dans le métabolisme et le devenir des xénobiotiques. Un certain nombre de considérations anatomiques, physiologiques et fonctionnelles peuvent être rappelées.

I. Rappel anatomique et physiologique

Le foie est un organe volumineux, richement vascularisé et présentant une architecture particulière avec les lobules formés de travées radiées d'hépatocytes et le système excréto-biliaire.

Le sang qui provient d'une part de l'artère hépatique et d'autre part du système veineux porte arrive dans la région périportale du lobule, circule dans les sinusoïdes entre les travées hépatocytaires jusque dans la région centrolobulaire ; le sang repart du foie par les veines sus-hépatiques. Le foie est le premier organe exposé après absorption intestinale d'un produit.

En fait, le foie comprend de nombreux types cellulaires : à côté des cellules parenchymateuses ou hépatocytes (80 %), existent d'autres cellules comme les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules de Ito (ou cellules stellaires).

L'hépatocyte a deux pôles : un pôle sinusoïdal ou niveau baso-latéral et un pôle biliaire ou niveau canaliculaire. Dans l'hépatocyte, le système des organelles est très développé et l'hépatocyte a une grande capacité pour métaboliser, activer et détoxifier des agents endogènes ou exogènes qui ont été véhiculés directement par le sang jusqu'à lui. Le foie intervient dans le métabolisme des acides aminés, des protéines, des lipides et des glucides et c'est le seul organe qui se régénère. Le métabolisme des xénobiotiques s'exerce selon deux grands processus, l'un comportant une modification de la structure chimique (fonctionnalisation) du xénobiotique par des réactions principalement d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et le second correspondant à une conjugaison avec un composé endogène qui aboutit à la formation d'un composé encore plus polaire, facilement excrétable par l'urine ou par la bile.

Les hépatocytes ne sont pas univoques et ils se distribuent en zones concentriques, d'activités métaboliques différentes, autour des axes constitués par les vaisseaux afférents, les vaisseaux lymphatiques et les canaux biliaires. Ainsi, ce sont les hépatocytes de la zone périportale, hépatocytes recevant un sang riche en nutriments et en oxygène qui, préférentiellement par exemple, synthétisent les protéines plasmatiques, participent au métabolisme du glucose et excrètent la bilirubine. Quant aux hépatocytes centrolobulaires, ils contiennent par exemple plus de réticulum endoplasmique lisse que les autres et présentent des activités monooxygénases cytochrome P-450 dépendantes importantes ; ils sont ainsi plus sensibles à l'agression toxique d'autant que leur contenu en glutathion et que l'activité UDP Glucuronyl Transférasique y sont plus faibles.

La bile est la sécrétion exocrine du foie. Cette formation se déroule en plusieurs phases. Lors de la phase d'excrétion canaliculaire, le flux biliaire est soit dépendant des acides biliaires avec sécrétion active de ceux-ci à travers la membrane canaliculaire, soit indépendant des acides biliaires par expulsion active de sodium puis

d'ions grâce à la pompe à sodium, ATPase $Na^+ - K^+$ dépendante. Le cytosquelette (microfilaments, microtubules) joue un rôle important dans la cholérèse en assurant l'acheminement intra-hépatocytaire des acides biliaires. Le long de la voie biliaire principale existe une sécrétion des bicarbonates et au niveau de la vésicule biliaire on assiste à une réabsorption d'eau et d'ions.

Le foie possède ainsi trois fonctions primordiales :

- il reçoit en abondance les substances nutritives et les xénobiotiques, puis les distribue dans l'organisme (fonction de sécrétion) ;
- il métabolise un certain nombre de xénobiotiques et de substances nutritives (fonction de transformation) ;
- il produit la bile grâce à sa fonction d'excrétion.

L'atteinte par les xénobiotiques de ces différentes fonctions peut ainsi être à l'origine de lésions hépatiques. De plus, dans les phénomènes toxiques peuvent intervenir : la modification du flux sanguin hépatique, l'existence d'un cycle entérohépatique, les cellules de Kupffer qui sont des macrophages résidant dans les sinusoïdes hépatiques.

II. Mécanismes de l'hépatotoxicité

A. Classification

Les réactions hépatotoxiques peuvent être classées d'après Zimmerman en deux catégories selon le caractère prévisible ou non des manifestations toxiques.

1. La toxicité prévisible

Elle est observée lorsque le mécanisme est en liaison avec une toxicité intrinsèque du xénobiotique ; elle correspond à une action directe du xénobiotique (ou d'un métabolite) sur des constituants cellulaires vitaux, sans intervention du système immunitaire. Elle présente les caractéristiques suivantes :

- elle est dose-dépendante ;
- la réadministration entraîne une récidive dans un délai comparable à celui de l'atteinte initiale ;
- les lésions sont reproductibles chez l'animal et sont présentes chez presque tous les membres d'une espèce sensible ;
- le risque est généralement augmenté par une induction enzymatique ;
- les signes d'hypersensibilité sont absents.

Il faut préciser cependant que des facteurs génétiques ou acquis peuvent moduler cette toxicité.

2. La toxicité imprévisible

Elle est liée à la vulnérabilité particulière de l'hôte et est caractérisée par :

- une absence de relation avec la dose ;

- une récidive très rapide après réadministration ;
- une absence de reproductibilité chez l'animal ;
- un risque non modifié par une induction enzymatique ;
- une observation possible de signes d'hypersensibilité (fièvre, éruption, éosinophilie).

Dans le cas de la toxicité imprévisible, deux types de réactions sont envisageables : toxicité de type *immunoallergique* et toxicité liée à une *prédisposition génétique*.
Cette classification proposée, dichotomique, est un peu arbitraire car certains toxiques peuvent donner les deux types de toxicité : exemples de l'halothane ou de l'isoniazide. De plus, ces deux types distincts peuvent être la conséquence d'un mécanisme unique : la production de *métabolites intermédiaires réactifs*. Il faut noter cependant que certains xénobiotiques sont directement hépatotoxiques.

B. Rôle des métabolites réactifs. Toxicité moléculaire. Toxicité fonctionnelle

1. Formation des métabolites réactifs

Il faut noter le rôle prépondérant du cytochrome P-450 ; cependant d'autres systèmes enzymatiques y compris des réactions de phase II des biotransformations peuvent conduire à des composés toxiques.

a) Rôle du cytochrome P-450

La biotransformation des xénobiotiques dans le foie est liée à la présence de systèmes enzymatiques essentiellement associés au cytochrome P-450. Un rôle prépondérant dans la bioactivation des xénobiotiques (dont certains médicaments) doit être attribué aux isoenzymes du P-450 (Phase I). Si les métabolites réactifs sont le plus souvent formés par oxydation (quinone-imine, époxydes), on connaît également des réactions de réduction conduisant à la formation d'espèces chimiques toxiques ; dans ce cas, le P-450 sous sa forme réduite, n'ayant pas encore fixé l'oxygène, peut transférer directement un électron sur le substrat et déshalogéner certains substrats par exemple, conduisant ainsi à la formation de radicaux libres. Les métabolites toxiques formés par le système enzymatique associé au P-450 appartiennent à plusieurs types.

■ *Les électrophiles*

Formés par oxydation, ils agissent comme agents alcoylants ou arylants : N-acétyl-p-benzoquinone imine (métabolite du paracétamol), époxydes d'arènes ou d'alcènes comme le 3,4 époxyde du bromobenzène, l'époxyde de l'aflatoxine B1, l'époxyde du chlorure de vinyle.

■ *Les radicaux libres*

Réactifs en raison de la présence d'un électron célibataire : $CF_3{}^{\bullet}CHCl$ à partir de l'halothane, CCl_3 (radical trichlorométhyle) à partir du tétrachlorure de carbone. Ces métabolites réactifs sont d'une manière générale inductibles par des inducteurs d'isoenzymes différentes du P-450 (Phénobarbital, 3 Méthylcholanthrène).

b) Rôle des autres systèmes

D'autres systèmes, enzymatiques (ou non), interviennent dans la formation de métabolites réactifs :

- une enzyme cytosolique comme l'alcool déshydrogénase (ADH) permet la formation d'acroléine à partir de l'alcool allylique ;
- certains xénobiotiques, dont le métabolisme par des enzymes microsomales (NADPH cytochrome P-450 réductase notamment) ou non implique la formation de radicaux libres, peuvent favoriser dans un cycle redox la production des formes activées de l'oxygène : anions superoxydes, eau oxygénée, radicaux hydroxyles et oxygène singulet. Ces espèces sont responsables de l'hépatotoxicité de certains nitroarènes (nitrofurantoïne par exemple) ;
- des composés toxiques peuvent apparaître au cours des réactions de conjugaison (Phase II). L'acétylaminofluorène (utilisé auparavant comme insecticide), après N hydroxylation, subit une réaction de sulfoconjugaison qui conduit au carcinogène ultime.

2. Mécanismes de protection

Un des mécanismes, incorporé dans le système du cytochrome P-450, est celui de l'autodestruction (« inactivation suicidaire ») du cytochrome P-450 : le métabolite réactif formé dans la poche hydrophobe du P-450 est très instable et va détruire l'enzyme qui l'a formé (alkylation d'un azote de l'hème, complexe stable avec le fer de l'hème, fixation irréversible sur un groupe nucléophile de l'apoprotéine). L'inactivation du P-450 auto-limite la formation du métabolite réactif.

Certains métabolites réactifs se réorganisent spontanément en métabolites stables : un époxyde par exemple peut se réarranger en phénol ou s'hydrater en dihydrodiol ; cette réaction est réalisée par des époxydes-hydrolases.

De nombreux métabolites réactifs se conjuguent au glutathion à l'aide d'enzymes cytosoliques et mitochondriales comme les glutathion-transférases et sont inactivés ; le glutathion maintient ainsi les groupements SH des protéines à l'état réduit, ces groupements étant nécessaires aux ATPases thiol dépendantes. Cette conjugaison consomme cependant du glutathion dont la concentration diminue.

La neutralisation des radicaux libres formés par les xénobiotiques (espèces réactives oxygénées) s'effectue par des enzymes : superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase, glutathion réductase. Des systèmes, enzymatiques ou non, s'opposent à la propagation de la peroxydation lipidique : glutathion peroxydase, glutathion, vitamines E et C...

Les lésions de l'ADN, au niveau des bases puriques et pyrimidiques, peuvent être réparées avant l'apparition d'une mutation somatique qui peut conduire à un cancer.

Ces mécanismes de protection expliquent que seule une petite partie du métabolite réactif va conduire à des lésions moléculaires.

En général, le métabolite étant très instable va réagir à l'endroit même où il est formé. C'est dans la région centrolobulaire plus riche en cytochrome P-450 que la région périportale du lobule que cette fixation sera plus intense.

3. Toxicité moléculaire *(fig. 1)*

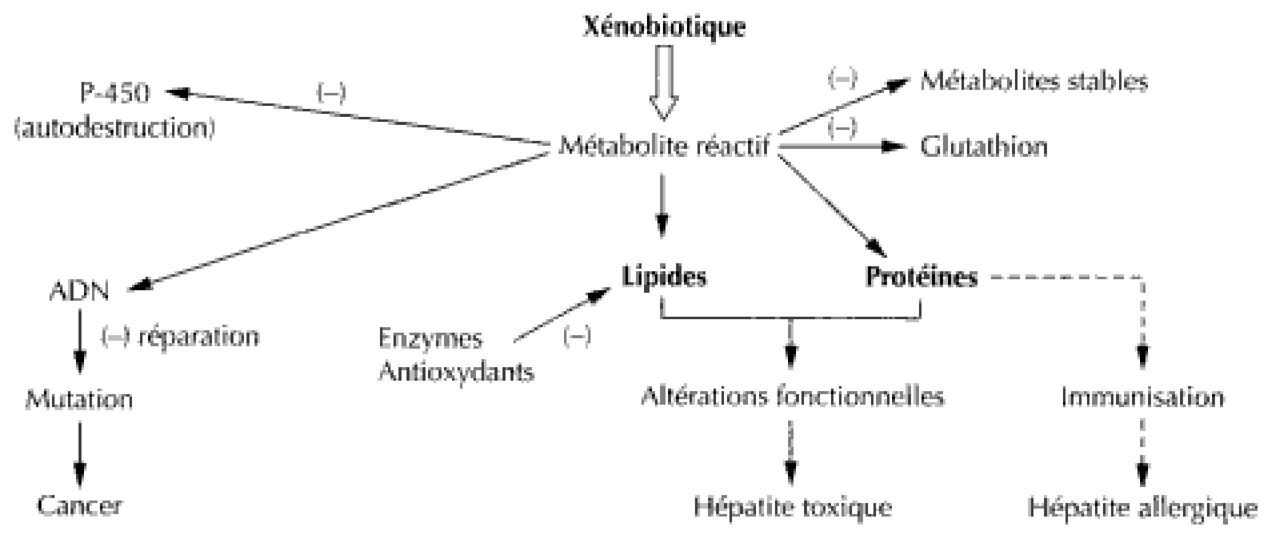


Figure 1. Toxicité par formation de métabolites réactifs et mécanismes de protection (–)

Le métabolite réactif peut attaquer diverses macromolécules hépatiques :

- le métabolite réactif électrophile peut se fixer par une liaison covalente irréversible :
  - sur l'ADN : l'alkylation d'une base purique ou pyrimidique (fixation sur NH2, – N =, oxygène), si elle n'est pas réparée rapidement avant la division cellulaire peut conduire à une mutation et à un cancer,
  - sur divers groupements fonctionnels des protéines nucléophiles : SH d'une cystéine, NH2 d'une lysine ou arginine, S d'une méthionine, NH d'une histidine. Cette fixation covalente pourra inactiver des enzymes, des protéines de transport ou des protéines régulatrices,
  - remarque : les liaisons sur l'ADN ou les protéines semblent dépendre de la « dureté » de la substance électrophile (c'est-à-dire la présence d'un centre très polarisé). Ainsi, un électrophile « dur » comme un époxyde polarisé réagira avec les acides nucléiques (nucléophiles durs), tandis qu'un électrophile « mou » comme un aldéhyde réactif réagira plutôt avec les protéines (nucléophiles mous) ;
- le radical libre $R^{\bullet}$, très réactif, peut se lier de façon irréversible aux macromolécules hépatiques (protéines, lipides insaturés) ; il peut également arracher un atome d'hydrogène d'un acide gras poly-insaturé (LH) *(fig. 2)*. Après remaniement de la position de la double liaison, le radical lipidique formé s'unit avec l'oxygène pour donner le radical peroxyde qui réagira à nouveau avec un autre acide gras L'H insaturé pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical lipidique. Ceci entraîne une réaction de lipoperoxydation qui s'autopropage et qui est à l'origine d'une destruction des membranes biologiques. Les molécules de lipides insaturés, au cours de la réaction, peuvent également être scindées en petits fragments dialdéhydiques qui pourront se fixer aux protéines. Les hydroperoxydes lipidiques peu réactionnels peuvent en présence de Fe^{2+} se « convertir » en radicaux alkoxyles très réactifs, (LOOH + Fe^{2+} $LO^{\bullet}$).

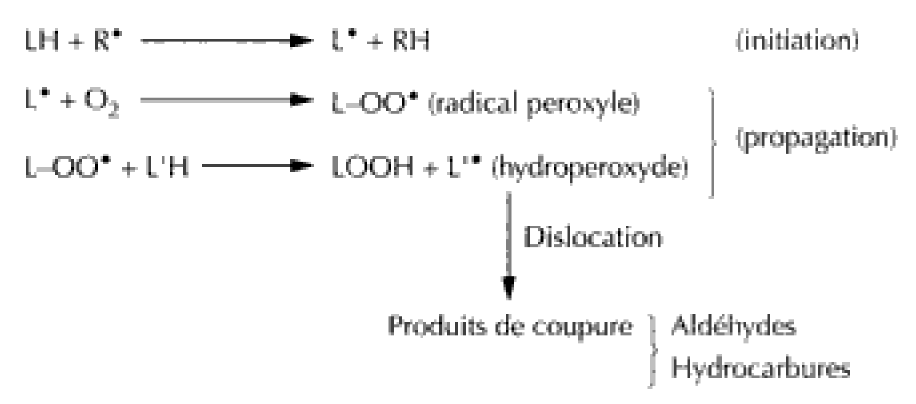


Figure 2. Peroxydation lipidique

4. Toxicité fonctionnelle et lésions

Peroxydation lipidique et fixation protéique peuvent être à l'origine de multiples perturbations fonctionnelles secondaires. Parmi celles-ci, la *nécrose* et la *cholestase* sont des lésions assez fréquemment observées avec les produits chimiques et aussi avec des médicaments.

Ce n'est que lors d'une ingestion massive du xénobiotique (produit chimique, médicaments), d'un métabolisme particulier ou d'une intervention du système immunitaire que l'attaque des macromolécules hépatiques peut conduire à une altération ou à une destruction des hépatocytes.

Nous insisterons sur les lésions telles que la nécrose et la cholestase qui peuvent apparaître lors d'une hépatite toxique ou d'une hépatite immunoallergique.

a) Hépatites toxiques

Les métabolites réactifs réagissent avec les groupes nucléophiles notamment les groupes SH et NH_2 des protéines et ils s'y fixent de manière covalente.

Les métabolites réactifs se conjuguent au glutathion et consomment ce tripeptide. Cette réaction de détoxification va dépasser les capacités de synthèse du glutathion et le taux hépatique de celui-ci va s'abaisser. La diminution du glutathion, la fixation covalente sur les thiols ou l'oxydation de ceux-ci va aboutir à une diminution des thiols protéiques.

Les conséquences de ces différentes altérations au niveau de la cellule sont nombreuses et délétères (*fig. 3*) :

- formation de macro-agrégats non fonctionnels d'actine par formation de ponts disulfures entre plusieurs molécules d'actine. Le réseau filamentaire d'actine qui normalement s'attache aux protéines de la membrane plasmique va ainsi être perturbé. Des boursouflures fragiles de la membrane plasmique vont en résulter ; elles peuvent faciliter la rupture de la membrane plasmique, aboutissant ainsi à la mort de la cellule ;
- diminution de l'activité des Ca translocases de la membrane plasmique. Ces enzymes rejettent, normalement, en permanence le calcium ionisé hors de l'hépatocyte, maintenant ainsi la concentration intracellulaire en calcium faible. L'inhibition des enzymes va donc entraîner une augmentation du calcium ionisé cytosolique. Cela aura pour conséquence d'activer des phospholipases, des protéases et des endonucléases dépendantes du calcium ionisé. L'activation des

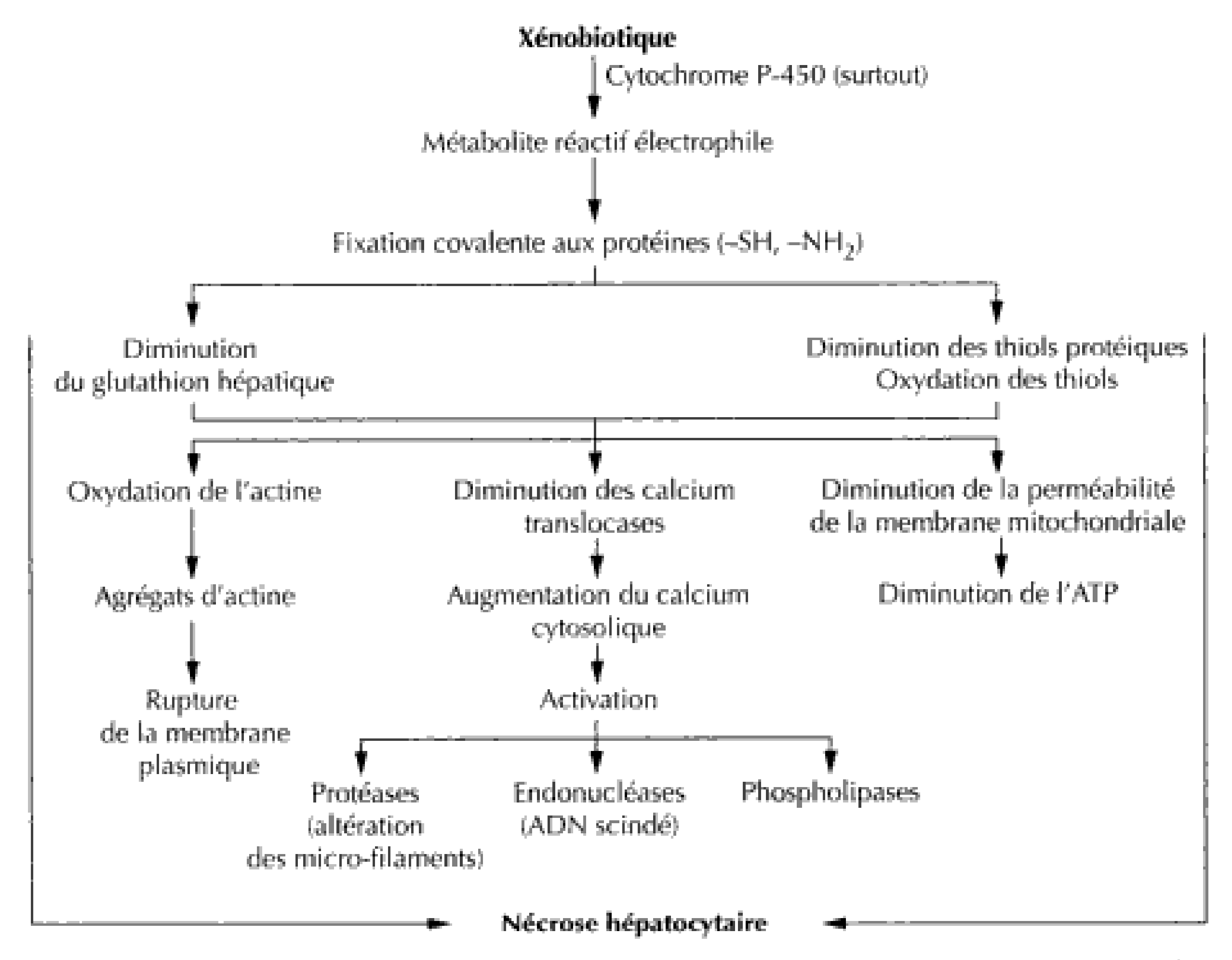


Figure 3. Lésions moléculaires et toxicité fonctionnelle observées dans la nécrose hépatocytaire (et partiellement dans la cholestase)

protéases calcium-dépendantes contribue à l'altération du réseau des microfilaments ; les endonucléases scindent l'ADN, ce qui peut conduire au phénomène d'apoptose ;
- augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne, abaissant le potentiel de membrane et la production d'ATP nécessaire à la synthèse du glutathion, à l'activité des calciums translocases et à la polymérisation de l'actine en micro-filaments.

Ces différentes altérations vont conduire à une *nécrose* des hépatocytes.

Au niveau biliaire, les lésions des pompes ioniques, les lésions filamenteuses du cytosquelette de la cellule (dans la région péricanaliculaire), l'augmentation de la perméabilité au niveau des jonctions paracellulaires concourent à la *cholestase* intrahépatique en perturbant les systèmes de transport hépatocytaire des acides biliaires.

Les hépatites toxiques surviennent après absorption massive d'un composé hépatotoxique. Cependant les faits malheureux vécus avec les médicaments montrent que des hépatites médicamenteuses peuvent apparaître après absorption d'une dose thérapeutique chez une minorité de patients. Dans ce cas, des *facteurs génétiques* ou des *facteurs acquis* pourraient expliquer la sensibilité particulière de ces sujets (« idiosyncrasie »).

■ *Rôle des facteurs génétiques*

Des influences génétiques peuvent se manifester sur la formation des métabolites réactifs ou sur l'absence de mécanismes d'inactivation de ces métabolites réactifs :

- la répartition des isoenzymes du cytochrome P-450 est sous contrôle génétique et variable selon les sujets. Certains métabolites réactifs peuvent être formés par une isoenzyme particulière. Un sujet peut présenter un taux constitutif élevé de cette isoenzyme ; il formera une grande quantité de ce métabolite et sera prédisposé à la toxicité ;
- l'absence d'un mécanisme d'inactivation des métabolites réactifs chez un sujet peut rendre ce dernier plus sensible à un xénobiotique : exemple d'un déficit en glutathion synthétase qui rendrait un sujet plus sensible à la toxicité du paracétamol.

■ *Rôle des facteurs acquis*

Des modifications acquises peuvent être d'origine physiologique, nutritionnelle ou thérapeutique :

- l'influence de la gestation est bien connue chez la souris : diminution de la capacité du foie à resynthétiser le glutathion avec pour conséquence l'augmentation de la toxicité du paracétamol ;
- la dénutrition et l'état de jeûne, chez l'homme, semblent jouer un rôle dans l'hépatotoxicité de certains médicaments. La toxicité (hépatite) du paracétamol a ainsi été décrite chez des individus dénutris ou en état de jeûne prolongé et recevant des doses thérapeutiques de cet analgésique. La baisse du glutathion hépatique causée par la dénutrition et l'induction de certaines isoenzymes du cytochrome P-450 (2E1) par l'état de jeûne pourraient expliquer l'apparition de cette toxicité ;
- l'induction de certaines isoenzymes du cytochrome P-450 par des médicaments (ou aliments) administrés de façon concomitante peut augmenter la formation d'un métabolite réactif. C'est ainsi que la rifampicine (inducteur enzymatique) augmente l'hépatotoxicité de l'isoniazide et que la consommation chronique d'éthanol (inducteur enzymatique) peut augmenter la toxicité du paracétamol administré à des « doses thérapeutiques élevées ».

Outre une hépatite toxique, les métabolites réactifs peuvent aussi induire des hépatites immuno-allergiques. Nous reprendrons l'exemple des hépatites médicamenteuses car d'assez nombreuses molécules peuvent donner ce type d'atteinte toxique. Nous devons préciser que les médicaments commercialisés (ayant obtenu l'AMM) seront souvent des molécules qui ne forment pas de métabolites toxiques lors d'une utilisation thérapeutique normale ou bien qui forment des métabolites réactifs mais en quantité insuffisante pour entraîner une destruction toxique des hépatocytes. Cependant, ces médicaments pourront entraîner une hépatite impliquant le système immunitaire.

b) Hépatites immuno-allergiques

La fixation covalente d'un métabolite réactif sur les protéines hépatiques va modifier le Soi de l'individu. Cette modification du Soi va entraîner chez quelques sujets une réaction immunitaire. Celle-ci peut être dirigée contre le Soi modifié : hépatite immuno-allergique ou bien contre le Soi non modifié : hépatite auto-immune ou

encore contre les deux à la fois. Les caractéristiques cliniques de ces hépatites sont compatibles avec un phénomène immuno-allergique.

■ *Réaction immunitaire contre le Soi modifié*

Ce mécanisme intervient dans le cas de l'halothane. Cet anesthésique, après transformation métabolique donne naissance, en milieu pauvre en oxygène, à un radical libre, responsable chez 20 % des sujets d'une atteinte directe modérée des hépatocytes. En revanche, la nécrose hépatique massive n'atteint qu'un très petit nombre de sujets et ne survient qu'après des expositions multiples, à intervalles rapprochés ; elle s'accompagne d'une hyperéosinophilie et de la présence d'anticorps antimicrosomes. Le métabolite responsable est formé en aérobie par le cytochrome P-450 : il s'agit d'un chlorure d'acyle réactif, CF_3COCl. Celui-ci réagit (cf. ci-dessous) avec les groupements – NH_2 des résidus lysines des protéines pour former des protéines trifluoroacétylées : CF_3CO-lysine-protéine. Chez les malades atteints d'hépatites, il existe dans leur sérum des anticorps dirigés contre la partie des protéines hépatiques qui a été modifiée par la liaison covalente avec le métabolite.

Le mécanisme intime de la réaction immunitaire aboutissant à la destruction des hépatocytes n'est pas encore parfaitement élucidé. Il impliquerait une présentation des peptides modifiés, par la liaison covalente, par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II aux lymphocytes T cytotoxiques (cf. articles de D. Peyssayre et P. Beaune *et al.* dans la rubrique « Pour en savoir plus »).

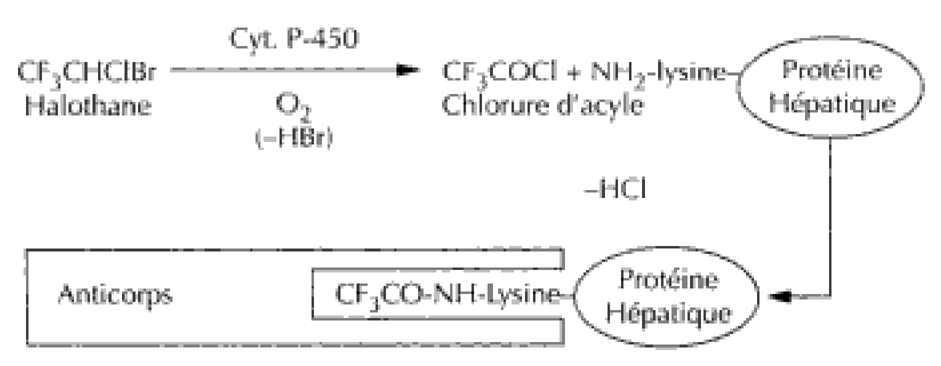
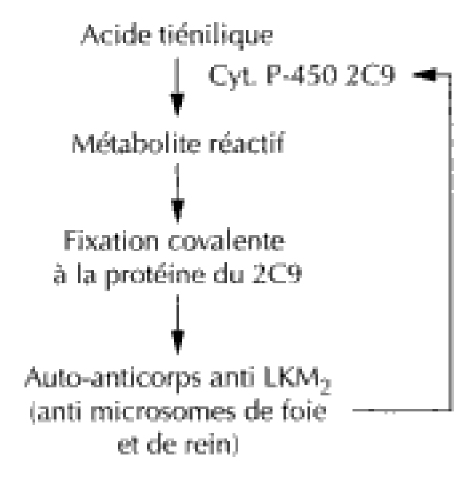
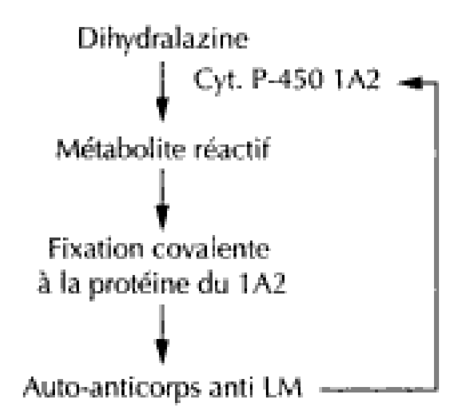


Figure 4. Mécanisme de la toxicité de l'halothane

■ *Réaction immunitaire contre le Soi non modifié*



Certaines cibles antigéniques pourraient être des épitopes normaux, non alkylés, des protéines. Certains de ces antigènes sont des isoenzymes du cytochrome P-450. Ceci a été montré d'abord avec un médicament hypotenseur, retiré du marché en 1992 pour cause d'hépatite cytolytique, l'acide tiénilique Diflurex®.
Cette hépatite est associée à la présence d'un *auto-anticorps* antimicrosomal (anti LKM_2). Cet auto-anticorps (cf. ci-contre) est dirigé spécifiquement contre l'isoenzyme du cytochrome P-450 2C9 transformant l'acide tiénilique en un métabolite réactif qui se fixe, de façon covalente, sur la protéine du cytochrome P-450.



On a observé le même mécanisme d'action toxique avec la dihydralazine Nepressol®, médicament antihypertenseur vasodilatateur (direct) et qui a été retiré du marché en 1998. L'isoenzyme du cytochrome P-450 métabolisant la dihydralazine est le cytochrome P-450 1A2 (cf. schéma ci-dessus).
Dans les cas de ces deux médicaments, les anticorps mis en évidence chez les malades reconnaissent avec forte affinité le cytochrome P-450 normal, non alkylé par le métabolite réactif ; ce sont donc des auto-anticorps. Le mécanisme d'apparition de ces auto-anticorps reste encore hypothétique (cf. articles de D. Peyssayre et P. Beaune *et al.* dans la rubrique « Pour en savoir plus »).
Tous les sujets forment probablement le métabolite réactif mais seuls quelques-uns parmi eux vont développer une immunisation et une hépatite. Il est donc très probable que, comme pour certaines hépatites survenant avec des médicaments administrés à dose thérapeutique, des *facteurs génétiques* sont impliqués dans les hépatites immuno-allergiques ou auto-immunes.

■ *Rôle des facteurs génétiques*

Ces facteurs semblent être de plusieurs ordres.

Déficit en un mécanisme de protection

Certains sujets seraient déficients en divers mécanismes de détoxification ; dans ce cas, une alkylation massive des protéines pourrait se produire et entraîner une immunisation plus fréquente. Les hépatites immuno-allergiques dues à la phénytoïne, la carbamazépine, l'halothane, l'amineptine et aux sulfamides apparaissent chez les individus présentant un déficit génétique en un mécanisme de protection (cf. articles : D. Peyssayre – D. Larrey *et al.* pour en savoir plus).

Déficit en une voie métabolique

Cette voie métabolique, présente chez beaucoup de sujets, détourne normalement le médicament de l'oxydation par le cytochrome P-450.

Il a été montré que chez les acétyleurs lents, la dihydralazine n'est pas détoxifiée par acétylation et le médicament subit alors une oxydation, par le Cyt. P-450 1A2, en un radical libre modifiant le cytochrome entraînant la formation des auto-anticorps anticytochrome et une hépatite auto-immune.
Les sulfonamides administrées chez les acétyleurs lents ne sont pas métabolisées par acétylation mais par le cytochrome P-450 qui les transforme en hydroxylamine. L'hépatite qui en résulte semble néanmoins faire intervenir d'autres mécanismes (notamment des facteurs intervenant dans les phénomènes de détoxification), (cf. articles de D. Pessayre et D. Larrey *et al.* dans la rubrique « Pour en savoir plus »).

Polymorphisme des molécules du CMH

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (ou HLA) sont chez l'homme très polymorphes. Certains médicaments donnent des hépatites chez des sujets ayant une molécule HLA donnée (exemples de l'halothane, du diclofénac, de la chlorpromazine, de la clométacine, de la nitrofurantoïne).

C. Autres mécanismes

L'hépatotoxicité peut être due au xénobiotique lui-même et non à un métabolite. Parmi les médicaments responsables de lésions hépatiques dues à la molécule native, on peut citer la tétracycline, à forte dose par voie intraveineuse, qui entraîne une stéatose et le maléate de perhexiline (utilisé autrefois dans le traitement de l'angor chronique) qui se fixe sur les phospholipides lysosomiaux.
La galactosamine s'incorpore dans le métabolisme du galactose mais conduit à une déplétion en UTP, affectant la synthèse de l'ARN et aussi celle de l'ADN. La galactosamine provoque une nécrose hépatique aiguë et en chronique : cirrhose et carcinome hépatocellulaire.
Récemment, diverses altérations de la *fonction mitochondriale* ont été impliquées dans des lésions hépatiques médicamenteuses.
Les altérations de la fonction mitochondriale : oxydation des acides gras et production d'ATP sont responsables de stéatose microvésiculaire (cf. stéatoses) et parfois de cytolyse hépatique.
Le mécanisme de la stéatose microvésiculaire consiste en une diminution importante de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras qui sont ensuite estérifiés en triglycérides.
Cette diminution de la bêta-oxydation peut être due :

- à une séquestration du coenzyme A (aspirine, acide valproïque) ou à une inhibition directe des enzymes intervenant dans la bêta-oxydation ;
- à un effet initial sur l'ADN mitochondrial. Dans ce cas, la diminution de la synthèse des polypeptides de la chaîne respiratoire empêche en partie la réoxydation du NADH, H^+, formé par la bêta-oxydation, en NAD^+ nécessaire au fonctionnement de la bêta-oxydation. L'inhibition de l'ADN mitochondrial peut se situer au niveau de la réplication (cas des didésoxynucléosides) ou de la transcription (cas de l'interféron alpha).

Certaines hépatites cytolytiques médicamenteuses pourraient être liées à un effet découplant de la molécule, avec diminution d'ATP (cas de la tacrine) ou à une inhibition de la chaîne respiratoire : toxicité du paracétamol à dose élevée par la

conjonction de la formation de métabolites réactifs et inhibition de la chaîne respiratoire, ce qui prouve que les métabolites toxiques et les altérations mitochondriales peuvent être en cause dans l'hépatotoxicité d'un même médicament.

III. Lésions hépatiques – manifestations cliniques

Les perturbations des fonctions hépatiques s'observent après exposition aiguë ou chronique. Elles peuvent se traduire :
- par des lésions à caractère aigu : nécrose, cholestase ;
- par des lésions à évolution chronique : hépatite chronique active, stéatose, cirrhose, lésions hépatovasculaires, tumeurs.

Les atteintes hépatiques provoquées par les xénobiotiques présentent donc une grande diversité et peuvent simuler toutes les formes cliniques d'hépatopathie. Les plus fréquentes sont cependant les hépatites parmi lesquelles il faut souligner les hépatites dues à des médicaments.

A. Les hépatites aiguës

Les xénobiotiques peuvent entraîner :
- des hépatites toxiques, conséquence de la pénétration dans l'organisme d'une dose élevée, massive d'une substance connue pour être hépatotoxique : toxicité usuelle du tétrachlorure de carbone, de l'acétaminophène lors d'un surdosage ;
- des hépatites idiosyncrasiques à doses usuelles, n'apparaissant que chez quelques sujets possédant une sensibilité particulière pour des raisons d'ordre génétique (par exemple sujets déficients en une isoenzyme particulière du cytochrome P-450) ou du fait d'une susceptibilité augmentée par des influences physiologiques, nutritionnelles ou thérapeutiques : baisse en glutathion lors de la grossesse, du jeûne ; induction ou inhibition enzymatique ;
- des hépatites immunoallergiques. Cette toxicité est suspectée par la présence de signes de sensibilisation à type de fièvre, hyperéosinophilie, rash cutané. Un certain nombre de médicaments semblent produire une hépatotoxicité par ce mécanisme immunoallergique. Au cours de ces hépatites peuvent apparaître des auto-anticorps anti-tissus variés. Le rôle de ces anticorps dans la nécrose hépatocytaire est mal défini.

Le bilan fonctionnel hépatique permet de préciser le type de l'hépatite : cytolytique, cholestatique ou mixte.

1. Les hépatites cytolytiques

Les formes à prédominance cytolytique sont les plus sévères. La lésion principale est la nécrose. Cette nécrose peut être localisée ou diffuse :
- nécrose hépatocytaire centro-lobulaire : les lésions prédominent dans la région centrolobulaire, là où les métabolites réactifs sont formés (hépatotoxicité de l'acétaminophène, du bromobenzène, de l'acétylhydrazine) ;
- nécrose périportale provoquée chez le rat par l'alcool allylique ;
- nécrose diffuse (galactosamine).

La nécrose peut être accompagnée d'un infiltrat inflammatoire et/ou de stéatose. Près de 50 % des hépatites aiguës cytolytiques observées après 50 ans sont d'origine médicamenteuse et les formes fulminantes mortelles sont beaucoup plus fréquentes que lors des hépatites virales. Les médicaments le plus souvent responsables figurent dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Principaux médicaments impliqués dans les hépatites médicamenteuses

Classe	Médicaments	Type d'atteinte hépatique
Anesthésiques généraux	Halothane	Hépatite cytolytique
Analgésiques et anti-inflammatoires	Sulindac Paracétamol Dextropropoxyphène Indométacine Phénylbutazone Autres AINS	Hépatite cytolytique ou mixte Hépatite cytolytique (prise massive, à dose usuelle chez l'alcoolique chronique) Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cytolytique ou mixte (rare) Hépatite cytolytique ou mixte (rare) Hépatite cytolytique ou mixte (rare)
Anti-infectieux	Ethylsuccinate d'érythromycine* Sulfamides antibactériens Isoniazide Rifampicine Pyrazinamide Amodiaquine Kétoconazole Griséofulvine, nitrofurantoïne	Hépatite mixte Hépatite mixte Hépatite cytolytique Augmentation de la cytolyse due à l'isoniazide (en association) Hépatite cytolytique Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cytolytique + mixte Hépatite cholestatique
Médicaments utilisés en cardiologie	Méthyldopa Amiodarone Phénindione Papavérine Aprindine	Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cytolytique rare Hépatite mixte rare Hépatite cytolytique Hépatite cholestatique
Médicaments utilisés dans les troubles neurologiques et psychiatriques	Acide valproïque Progabide Phénytoïne Dantrolène Disulfirame Iproniazide Imipramine Amineptine Chlorpromazine Tacrine	Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cytolytique (cas mortels) Hépatite cytolytique Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cholestatique Hépatite cytolytique
Médicaments divers	Noréthandrolone (anabolisant alkylé en C17) Sulfamides hypoglycémiants Œstrogènes et progestatifs Ciclosporine, azathioprine Méthotrexate Mercaptopurine Cimétidine, ranitidine	Hépatite cholestatique Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cholestatique ou mixte Hépatite cholestatique rare Hépatite cytolytique Hépatite cholestatique Hépatite cholestatique rare

D'après Ph. DOROSZ, *Guide pratique des médicaments*, 18e édition, 1998 Ed. MALOINE.
* Les macrolides, en général, peuvent donner une hépatite cholestatique sauf ceux en C16 et sauf la spiramycine.
Remarques importantes :
– des médicaments ont été retirés du marché pour cause d'hépatotoxicité. Citons : clométacine, pirprofène, acide tiénilique (cas mortels), médicaments à base de germandrée petit-chêne (Teucrium chamaedrys), moxisylite, alpidem…
– la liste des médicaments n'est pas exhaustive et elle doit être, malheureusement, « actualisée » (rôle de la pharmacovigilance). Le dernier médicament mis en cause en 1998 a été la coumarine utilisée dans le traitement de l'insuffisance veineuse des membres inférieurs (hépatite cytolytique).

Mais de très nombreux agents chimiques industriels sont aussi hépatotoxiques et peuvent conduire à des hépatites : alcool aliphatique (alcool allylique), hydrocarbures nitrés (nitropropane), hydrocarbures aromatiques (bromobenzène), hydrocarbures aliphatiques halogénés (tétrachlorure de carbone, chloroforme, tétrachloroéthane), composés minéraux (phosphore, béryllium). À propos des solvants, il faut souligner les interactions entre les solvants eux-mêmes et entre les solvants et l'éthanol (en chronique celui-ci est inducteur enzymatique) ou médicaments.

2. Les hépatites cholestatiques

Rarement isolée, la cholestase peut être le syndrome essentiel, prédominant également, le plus souvent dans la région centrolobulaire. Il s'agit d'un blocage de la sécrétion de la bile au niveau de l'hépatocyte ou au niveau des canalicules biliaires (cholestase intrahépatique). Les xénobiotiques responsables de cette atteinte sont représentés surtout par des médicaments *(tab. 1)*.

3. Les hépatites aiguës mixtes

Ce type d'hépatite est le plus fréquent ; la gravité de l'affection dépend essentiellement de l'intensité de la cytolyse. Ces hépatites peuvent survenir après la prise de certains médicaments *(tab. 1)*.
L'amanite phalloïde et le phosphore blanc (utilisé dans certains pays comme raticide) sont responsables d'hépatites aiguës mixtes, à prédominance cytolytique.
Certains produits industriels sont également responsables de ce type de lésion : méthylène dianiline (durcisseur de résines), diméthylformamide (solvant).

B. Les surcharges hépatiques

Il s'agit des *stéatoses* c'est-à-dire de l'envahissement du foie par les lipides, des triglycérides en l'occurrence, dont la concentration hépatique passe de 5 à 50 %. Il existe également des surcharges en phospholipides (phospholipidoses), dans les lysosomes.

1. Surcharge en triglycérides : stéatose

On distingue deux grands types de stéatose selon leurs caractéristiques histochimiques.

a) Aspect histologique

La stéatose est souvent associée à d'autres lésions hépatocytaires ; elle peut aussi être isolée.
On distingue la stéatose macrovacuolaire et la stéatose microvésiculaire.

■ *La stéatose macrovacuolaire*

L'hépatocyte est occupé par une vacuole volumineuse lipidique unique. Cliniquement, elle est très souvent asymptomatique (exemple de l'éthanol au début de l'intoxication chronique).

■ *La stéatose microvésiculaire*

L'hépatocyte est augmenté de volume et contient de nombreuses petites gouttelettes dans son cytoplasme. Cette forme est cliniquement symptomatique ; elle peut conduire à une insuffisance hépatique et au décès.

L'expression biochimique de la stéatose hépatique due à certains xénobiotiques peut relever de plusieurs mécanismes (*fig. 5*).

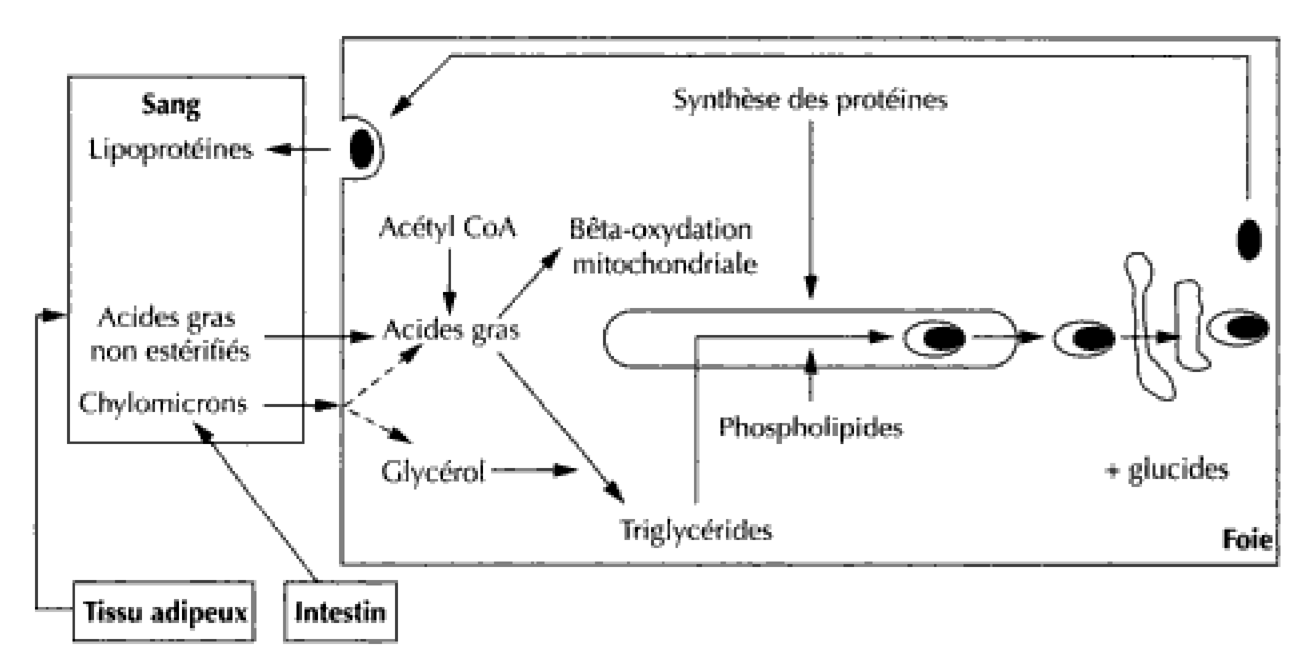


Figure 5. Principaux mécanismes de la stéatose hépatique (selon Timbrell)

b) Mécanismes

■ *Augmentation de la synthèse des triglycérides hépatiques*

Celle-ci peut avoir plusieurs causes :

- augmentation de la mobilisation périphérique à partir du tissu adipeux. Ceci est observé dans les phénomènes de lipolyse. Les acides gras et le glycérol véhiculés par le sang forment dans le foie des triglycérides ;
- augmentation de la synthèse hépatique des acides gras (observée avec le phénobarbital) ;
- diminution de la dégradation oxydative des acides gras au niveau des mitochondries. Comme nous l'avons vu précédemment (mécanismes généraux de l'hépatotoxicité), les acides gras dont l'oxydation est diminuée sont estérifiés en triglycérides ; l'atteinte de l'ADN mitochondrial peut retentir également sur le bon fonctionnement de la bêta-oxydation.

■ *Perturbation de l'assemblage et/ou de la sécrétion des lipoprotéines du foie vers le sang*

- par défaut de l'assemblage dans l'appareil de Golgi : les lipides et les apoprotéines ne s'associent pas aux glucides ;
- par blocage de la synthèse des apoprotéines à différents niveaux : ADN, ARN. Au niveau de la transcription agissent : alpha-amanitine, puromycine, actinomycine D. Au niveau de la traduction agit la tétracycline.

c) Les principaux agents (ou processus) stéatogènes

■ *Des toxiques non médicamenteux*

Alpha-amanitine, phosphore blanc, certains composés de l'arsenic, tétrachlorure de carbone, certains composés du cuivre, l'alcool éthylique. Cet alcool donne aussi bien des stéatoses macrovacuolaires que microvésiculaires ; cette dernière peut évoluer vers une hépatite alcoolique.

■ *Des médicaments*

La stéatose macrovacuolaire est observée avec les glucocorticoïdes (diminution de la sécrétion des triglycérides, augmentation de la lipolyse), la L-asparaginase (diminution de la sécrétion des triglycérides, diminution de la synthèse des apoprotéines), le méthotrexate (qui donne en plus une fibrose et une cirrhose).
La stéatose microvésiculaire est surtout observée avec des médicaments :

- qui diminuent la bêta-oxydation des acides gras : acide valproïque, glucocorticoïdes, tétracyclines : oxytétracycline mais seulement à forte dose par voie intraveineuse chez la femme enceinte ou l'insuffisant rénal, les AINS de type 2-arylpropionique (naproxène, kétoprofène, ibuprofène, qui peuvent donner également une hépatite), l'amineptine (qui donne également une hépatite cholestatique), la tianeptine, les hormones sexuelles femelles : œstradiol et progestérone, qui peuvent induire une stéatose gravidique chez certaines femmes enceintes. L'aspirine peut donner une stéatose microvésiculaire à dose massive mais aussi à dose thérapeutique. Le syndrome de Reye qui apparaît chez l'enfant est une maladie grave due à la prise d'aspirine associée à une infection virale, un déficit de la bêta-oxydation et à un état de jeûne qui augmente la lipolyse. L'amiodarone et la perhexiline donnent en plus de la stéatose microvésiculaire une phospholipidose et une stéatohépatite ;
- qui perturbent l'ADN mitochondrial, c'est le cas des didésoxynucléosides : zidovudine, didanosine, zalcitabine ou de l'interféron alpha.

■ *Un déséquilibre alimentaire*

Un régime riche en triglycérides, déficient en choline et en protéines donne un « foie gras » qui se voit macroscopiquement (gavage des oies et canards).

2. Surcharge en phospholipides

Elle est observée avec deux médicaments : l'amiodarone (anti-arythmique et anti-angoreux) et le maléate de perhexiline (anti-angoreux dont l'utilisation thérapeutique est maintenant abandonnée).
Ces deux molécules, amphiphiles cationiques s'accumulent dans le lysosome ; elles diminuent également la bêta-oxydation mitochondriale.
Après plusieurs mois de traitement par ces deux médicaments, il peut apparaître un autre type de lésion : la stéatohépatite, identique pratiquement à l'hépatite alcoolique observée lors de l'abus d'éthanol. Enfin, l'amiodarone et la perhexiline inhibent aussi le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui entraîne la baisse de la production d'ATP et l'apparition d'une nécrose hépatocytaire.

C. Les granulomes

Les hépatites granulomateuses sont définies histologiquement par des amas de cellules épithéliales entourés de lymphocytes et qui sont situés dans le parenchyme hépatique. Ces granulomes peuvent être associés à d'autres lésions hépatiques. L'hépatite est classée dans les hépatites immuno-allergiques.
Mis à part le béryllium (utilisé dans l'industrie aéronautique), les granulomes sont dus à des médicaments. L'hépatite se révèle sous une forme aiguë. Ce type d'hépatite est cependant rare.
Citons les médicaments les plus fréquemment imputés : phénylbutazone, quinidine, allopurinol, carbamazépine, chlorpropamide, méthyldopa, sulfamides divers, tacrine.

D. Les lésions vasculaires

1. Lésions des sinusoïdes

a) Fibrose périsinusoïdale

Elle résulte de l'accumulation de fibres de collagène. Certains produits chimiques en sont responsables : chlorure de vinyle, dérivés arsenicaux, sulfate de cuivre, de même que certains médicaments : vitamine A (en utilisation prolongée), méthotrexate, oxyde de thorium (Thorotrast®, produit de contraste aux rayons X, maintenant abandonné).

b) Dilatation sinusoïdale

Elle entraîne hépatomégalie et douleurs abdominales ; elle est observée avec les contraceptifs oraux.

c) Péliose

Elle est caractérisée par l'existence de cavités intra-lobulaires remplies de sang et distribuées dans le parenchyme hépatique. Elle peut s'accompagner d'hypertension portale, d'ictère et d'insuffisance hépatocellulaire. Elle est due surtout aux androgènes anabolisants, l'azathioprine, la vitamine A, le chlorure de vinyle, les dérivés arsenicaux, le Thorotrast®.

2. Lésions du système veineux hépatique efférent

a) Obstruction des veines sus-hépatiques avec hypertension portale et insuffisance hépatocellulaire.

Elle survient après administration d'azathioprine, de mitomycine C. La bioactivation des alcaloïdes de structure de la pyrrolizidine des espèces *crotalaria*, *heliotropium* et *senecio* est responsable d'une telle affection que l'on peut observer avec ces plantes (ces alcaloïdes sont retrouvés en faible quantité dans la bourrache et le tussilage).

b) Thrombose des veines sus-hépatiques

Manifestation exceptionnelle, cette thrombose, responsable du syndrome de Budd-Chiari, peut apparaître lors de l'utilisation de contraceptifs oraux et d'antimitotiques comme la dacarbazine.

c) Artère hépatique et ses branches

Cette lésion se traduit par une hyperplasie du foie et est observée avec les contraceptifs oraux.

d) Veine porte

La lésion consiste en des thromboses qui peuvent être observées avec les contraceptifs oraux.

E. Hépatites chroniques actives et cirrhose. Lésions des canaux biliaires intra-hépatiques

1. Hépatites chroniques actives

Elles relèvent de causes variées : virales, auto-immunes et aussi médicamenteuses. C'est une entité caractérisée par une lésion chronique et diffuse du foie ; ce sont des lésions nécrotique et inflammatoire. Le risque évolutif majeur est le développement d'une cirrhose. Les accidents s'observent surtout chez la femme après prise de médicaments pendant au moins 6 mois. Dans le sérum des patients atteints il existe souvent des anticorps anti-tissus.
Les médicaments les plus fréquemment en cause sont la méthyldopa et la nitrofurantoïne ; les accidents avec l'amineptine et la papavérine sont moins fréquents. Suite à ce type d'hépatotoxicité, les médicaments suivants ont été retirés du marché : clométacine, oxyphénisatine, acide tiénilique, germandrée petit-chêne.

2. Fibroses, cirrhoses

Ce phénomène chronique met en jeu un mécanisme inflammatoire, souvent médié par les cytokines. Les hépatocytes sont remplacés par des fibres de collagène du tissu conjonctif.
Sont impliqués : l'éthanol, les dérivés arsenicaux et des médicaments : vitamine A à forte dose (50 000 à 100 000 UI/jour pendant 6 à 12 mois chez l'adulte), l'acitrétine (utilisée dans le psoriasis pustuleux), le méthotrexate au long cours (traitement du psoriasis et de la polyarthrite rhumatoïde). L'étrétinate, rétinoïde utilisé en dermatologie a été retiré du marché.

3. Lésions des canaux biliaires intra-hépatiques

L'évolution peut se faire vers une cirrhose biliaire. Les médicaments responsables sont la chlorpromazine, l'imipramine, le tolbutamide, le thiabendazole. L'arrêt du médicament n'empêche pas la progression des lésions.

F. Tumeurs

Des tumeurs bénignes peuvent être observées avec les contraceptifs oraux.
Il existe des composés entraînant des cancers primaires du foie : hépatocarcinomes observés avec les androgènes anabolisants et l'aflatoxine B1, angiosarcomes (tumeurs vasculaires) dus aux dérivés arsenicaux, au chlorure de vinyle (et auparavant à l'oxyde de thorium).
Les fibrates, médicaments hypocholestérolémiants provoquent une prolifération des peroxysomes. Le cancer du foie observé chez les rongeurs est cependant espèce-dépendant et n'atteint pas l'homme.

Conclusion

Les xénobiotiques peuvent induire des lésions diverses d'un organe clé du métabolisme et de la sécrétion comme le foie. Parmi les xénobiotiques, les *médicaments* peuvent être responsables d'une hépatotoxicité qui se manifeste le plus souvent par des hépatites aiguës ou chroniques.
La détection du potentiel hépatotoxique, mettant en œuvre des études *in vivo* chez l'animal ainsi que des études *in vitro*, conditionne l'autorisation de mise sur le marché des médicaments.
Les molécules hépatotoxiques sont cependant fréquentes ; leur toxicité est très souvent due à des sensibilités individuelles (idiosyncrasie, réactions immuno-allergiques).
Il est très important pour le clinicien de détecter cette « iatrogénie » médicamenteuse pour mettre en œuvre le traitement curateur qui consiste en l'arrêt définitif du médicament (exceptionnellement les corticoïdes dans les hépatites chroniques immuno-allergiques). La surveillance biologique de certains traitements médicamenteux a une grande importance.
Un certain nombre de médicaments ont été retirés du marché en raison d'une hépatotoxicité. Ceci souligne le rôle capital de la *pharmacovigilance* pour l'imputation d'un médicament dans l'hépatotoxicité.
Il ne faut pas oublier néanmoins le rôle d'autres xénobiotiques dans les atteintes hépatiques : produits chimiques, contaminants des aliments. Ceci nécessite une surveillance qui s'effectue par la *toxicovigilance*.

L'essentiel de la question

Les xénobiotiques, parmi lesquels les médicaments, peuvent induire une *hépatotoxicité*. Deux raisons semblent importantes pour expliquer la fréquence de cette atteinte du foie : le nombre non négligeable de médicaments potentiellement hépatotoxiques et le fait que cet organe occupe une position clef dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques.

Les mécanismes biochimiques impliqués mettent très souvent au premier plan le rôle des *métabolites réactifs toxiques* formés en majorité par le système des monooxygénases à cytochrome P-450 et qui réagissent avec les constituants cellulaires ; des altérations de la *fonction mitochondriale* semblent également jouer un rôle important dans l'hépatotoxicité.
Celle-ci peut être *prévisible* et résulte d'une action directe du xénobiotique ou de son métabolite sur des constituants cellulaires vitaux (hépatites toxiques) ou *imprévisible*, n'apparaissant que chez certains sujets chez lesquels une réponse du *système immunitaire* va conduire à une réaction toxique contre les cellules hépatiques (hépatites immuno-allergiques et auto-immunes).
Cependant, dans les deux cas *d'hépatites toxique* ou *immuno-allergique*, la formation de métabolites réactifs est le point de départ de la réaction délétère. Dans les deux cas également interviennent des facteurs génétiques ou acquis pouvant expliquer la susceptibilité de quelques sujets : isoenzymes du cytochrome P-450, modifications physiologiques, nutritionnelles ou thérapeutiques pour les hépatites toxiques, facteurs génétiques métaboliques et polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité pour les hépatites immuno-allergiques ou auto-immunes.
Les lésions hépatiques s'observent après exposition aiguë ou chronique et sont très diverses. Les lésions à caractère aigu sont des lésions de nécrose et cholestase, elles sont fréquentes dans les *hépatites médicamenteuses*. Les lésions d'évolution chronique sont les hépatites chroniques actives, la stéatose mais aussi des lésions vasculaires et des tumeurs.
La détection du potentiel hépatotoxique des médicaments est fondamentale avant leur mise sur le marché. La surveillance biologique de certains traitements médicamenteux est aussi très importante. Dans la détection des accidents qui peuvent néanmoins se produire les *vigilances* à mettre en œuvre sont impératives : pharmacovigilance dans le domaine du médicament, toxicovigilance dans le domaine des produits chimiques utilisés dans l'industrie et des contaminants alimentaires.

Pour en savoir plus

- Beaune PH, Lecoeur S. *Immunotoxicology of the liver : adverse reactions to drugs*. J Hepatol 1997 ; 26 (suppl. 1) : 36-41.
- Berson A, Fromenty B, Letteron P, Pessayre D. *Rôle des mitochondries dans l'hépatotoxicité des médicaments*. Gastroenterol : Clin Biol 1998 ; 22 : 59-72.
- Doutrellot-Philippon C, Haguenoer JM, Capron J.-P. *Affections hépatiques professionnel les dues à des agents chimiques*. Gastoenterol : Clin Biol 1993 ; 17 : H66-H78.
- Larrey D, Pageaux GP. *Genetic predisposition to drug-induced hepatotoxicity*. J Hepatol 1997 ; 26 (suppl. 2) : 12-21.
- Pessayre D. Mécanisme des hépatites médicamenteuses. Gastoenterol : Clin Biol 1995 ; 19 : B47-B56.

Mécanismes et manifestations de l'action toxique au niveau rénal

G. DIRHEIMER, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, UPR 9002, Strasbourg.
E. CREPPY, Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen, Bordeaux II.
F. SICHEL, Département de Toxicologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen Basse-Normandie (révision 2007).

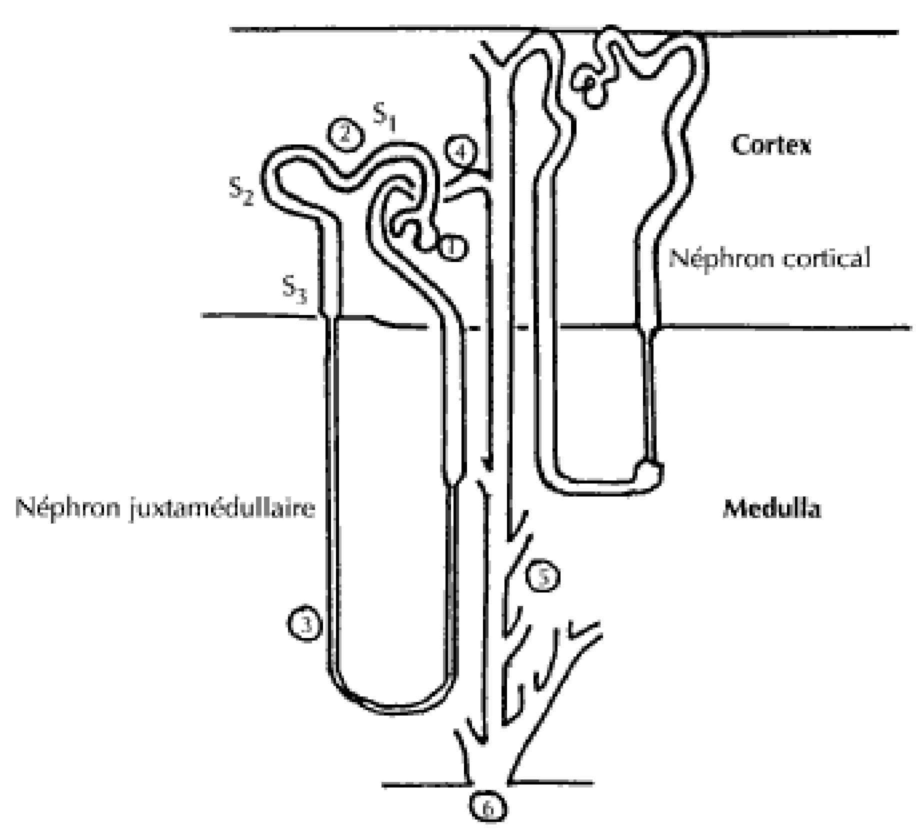
Le rein des mammifères est un organe très complexe, à la fois du point de vue anatomique et du point de vue fonctionnel. Son rôle essentiel est l'excrétion des catabolites des différents métabolismes et celle des xénobiotiques et de leurs produits de transformation, mais il intervient également dans l'homéostasie en participant à la conservation du volume des fluides et à l'osmolarité du milieu intérieur. De plus, un certain nombre d'hormones sont formées dans le rein (érythropoïétine, rénine, 1,25-dihydroxy vitamine D3 ainsi que plusieurs prostaglandines et kinines). Il a enfin des fonctions de métabolisme et de catabolisme.
Une atteinte toxicologique du rein peut affecter l'une ou l'ensemble de ces fonctions. Cependant, les effets toxiques signalés habituellement se rapportent surtout à la fonction excrétrice du rein comme l'augmentation de l'urée sanguine ou celle de la créatinine plasmatique. Cela ne signifie pas nécessairement que c'est cette fonction qui est la première à être touchée par les néphrotoxiques, mais plutôt que c'est elle qui se mesure le plus rapidement et de la façon la plus reproductible. C'est pourquoi ces deux indices cliniques de l'atteinte toxique du rein reflètent plutôt l'état actuel de la technologie et l'on est toujours à la recherche d'un marqueur précoce de cette atteinte.

I. Anatomie et physiologie rénale

Pour une description générale de la morphologie du rein, on consultera un abrégé d'anatomie et de physiologie humaine.
Rappelons l'existence de deux parties bien distinctes dans le rein : le cortex et la medulla qui renferment chacun une séquence de l'unité fonctionnelle du rein qui est le néphron.
Le néphron est un tube borgne à une extrémité (capsule de Bowman) et se termine à l'autre extrémité dans le bassinet. Il est formé d'une seule couche de cellules. Le rein humain en contient environ 1,3 million et le rein de rat environ 30 000 à 40 000. Il y a deux types de néphrons : les néphrons corticaux et les néphrons juxtamédullaires. Tous les néphrons ont leurs glomérules dans le cortex. Des parties plus ou moins importantes de la *pars recta* et de l'anse de Henlé se trouvent dans la medulla (*fig. 1*).
On peut distinguer trois parties dans le néphron : les artérioles afférentes qui donnent naissance à la pelote de capillaires pénétrant dans la capsule de Bowman, le glomérule et le tubule.

A. Artérioles et capillaires

C'est au niveau des artérioles afférentes qu'est formée la rénine. Les parois de ces capillaires sont constituées de cellules endothéliales fenêtrées (diamètre des pores : 50-100 nm). Les pores ont une charge négative et peuvent donc empêcher des molécules anioniques de passer.
La pression sanguine appliquée aux glomérules est autorégulée et maintenue pratiquement constante, tant que la pression artérielle est au-dessus de 80 mm de mercure. Environ 25 %, donc 1 200 mL du débit cardiaque, passent par les reins par minute. Sur ce volume, 120 mL de plasma sont filtrés par minute par les deux reins chez l'homme,



1 : glomérule ; 2 : tube contourné proximal ; S3 : pars recta ; 3 : anse de Henlé ;
4 : tube contourné distal ; 5 : tube collecteur de Bellini ; 6 : papille

Figure 1. Le Néphron

ce qui représente 180 L par jour. Il existe également un contrôle hormonal du flux sanguin rénal résultant d'un équilibre entre l'angiotensine II vasoconstrictrice et la prostaglandine E2 vasodilatatrice. Certains néphrotoxiques, comme les inhibiteurs des cyclo-oxygénases, peuvent agir en diminuant l'irrigation sanguine du rein. Le retour du sang se fait par l'artériole efférente qui mène à un autre réseau de capillaires situé plus loin autour des autres segments du néphron.

B. Glomérule

L'extrémité du néphron s'invagine pour former la capsule de Bowman. Elle est formée de cellules épithéliales qui envoient des ramifications (des pédicelles) vers les cellules endothéliales des capillaires. Elles possèdent également des pores. Entre les deux couches de cellules se trouve une membrane basale, constituée de collagène (ou de protéines apparentées) et d'autres glycoprotéines et protéoglycanes. La membrane est chargée négativement et forme une couche continue que l'on pense être la barrière majeure s'opposant à la filtration des macromolécules. En effet, la filtration de protéines dont la masse dépasse 70 kDa est insignifiante dans les conditions physiologiques normales.

Des cellules mésangiales se trouvent dans le tissu connectif du glomérule. Leur contraction peut réduire le coefficient d'ultrafiltration.

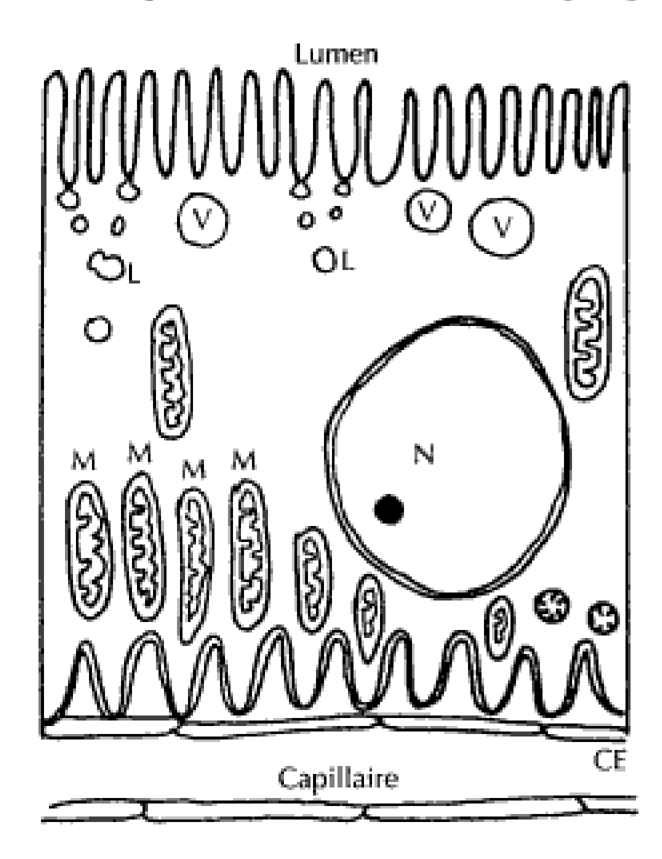
L'urine primitive, appelée filtrat glomérulaire, a une composition à peu près identique à celle du plasma (même osmolarité, même pH) sans les protéines et les substances de masse moléculaire élevée. En fait, malgré le diamètre important des pores des cellules endothéliales des artérioles, le glomérule se comporte comme un

filtre dont les pores auraient un diamètre de 10 nm. Les substances dont les masses moléculaires sont inférieures à 7 000 passent librement, les plus grosses voient leur passage restreint et les molécules de masse supérieure à 70 000 sont arrêtées presque entièrement. Ainsi, on ne retrouve que 0,1 g/L d'albumine sérique dans l'urine. Les molécules liées aux protéines sanguines comme l'albumine ne sont donc pas filtrées, seules leurs fractions libres le sont.

C. Tubule

1. Tubule contourné proximal (*pars convoluta*)

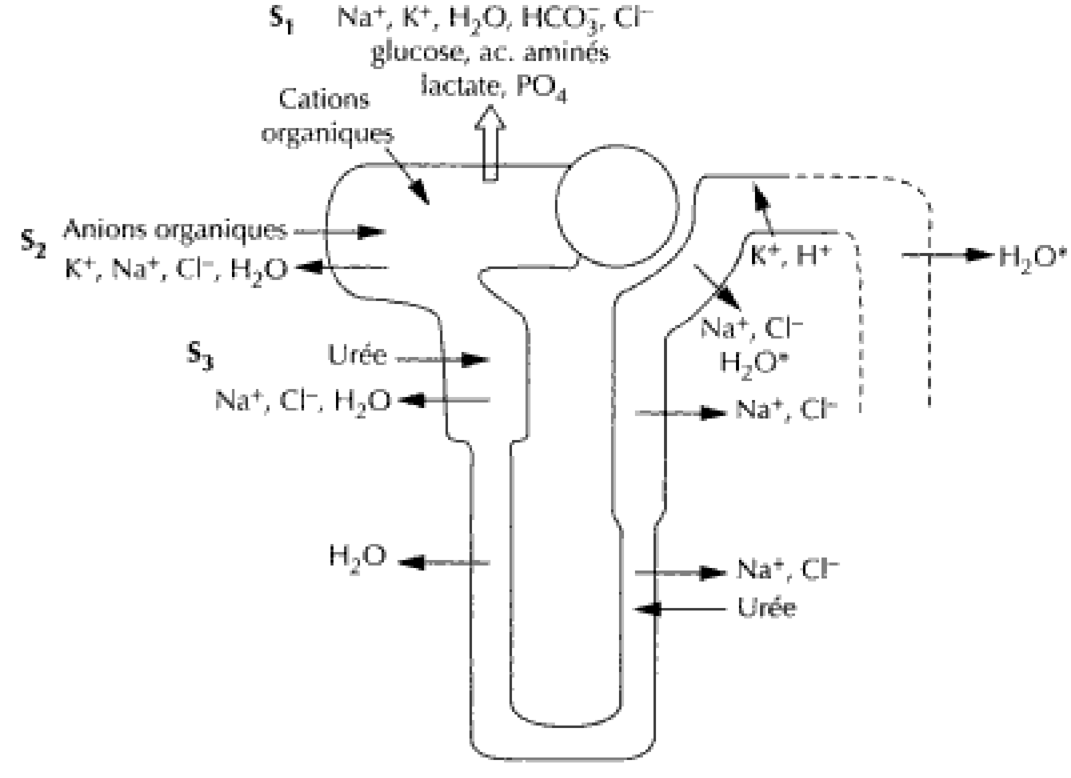
Celui-ci s'enroule en plusieurs boucles (partie appelée S_1) (*fig. 1*).
Il est constitué de cellules épithéliales munies du côté de la lumière urinifère (lumen) d'une membrane en bordure en brosse. Il y a environ 6 500 microvilli par cellule chez la souris, ce qui augmente la surface apicale de la cellule d'environ 40 fois. Des tubules formés par l'invagination de la membrane apicale entre les microvilli sont suivis à l'intérieur de la cellule par des vésicules qui peuvent fusionner en vacuoles elles-mêmes fusionnant avec des lysosomes (*fig. 2*).
L'ensemble constitue le système d'endocytose des cellules épithéliales qui s'applique par exemple aux métaux. Du côté basal, donc vers le tissu interstitiel, se trouvent de nombreuses mitochondries allongées. Des interdigitations existent également du côté basal (*fig. 2*).
Ces cellules réabsorbent 98-99 % des sels et de l'eau du filtrat glomérulaire. Il y a pratiquement réabsorption complète des sucres, acides aminés et lactates. La cellule tubulaire, en revanche, est imperméable à la créatinine et peu perméable à l'urée. Elle



V : vacuole ; L : lysosome ; M : mitochondrie ; P : peroxysome ; N : noyau ; CE : cellule endothéliale.

Figure 2. Ultrastructure d'une cellule des tubules proximaux

possède de nombreux systèmes de transport actif lui permettant de rejeter les ions Na^+ résorbés au niveau du lumen, vers le tissu interstitiel. Un système de transport actif saturable pour des groupes d'acides aminés (acides, basiques ou neutres), de polypeptides et de petites protéines existe également. Tous ces transports actifs consomment de l'énergie, ce qui explique la forte consommation d'oxygène des reins. Remarquons que les polypeptides tels que l'insuline et même des protéines sont catabolisés dans la cellule tubulaire. De nombreuses autres substances, en particulier les xénobiotiques *liposolubles et non ionisés* sont absorbés par diffusion passive.
Diverses substances peuvent également migrer entre les cellules, le tissu épithélial étant lâche.
Si la substance est ionisée dans le filtrat glomérulaire, ou si elle est polaire, elle sera excrétée dans l'urine. Le pH de l'urine est évidemment un facteur important dans cette élimination. Les bases sont donc plus rapidement éliminées si l'urine est acide et vice versa pour l'élimination des acides.
La diffusion passive des xénobiotiques du plasma dans l'urine à travers les cellules tubulaires est un autre mécanisme d'élimination. Au contraire, la sécrétion active est un mécanisme important pour l'élimination des composés ionisés. Elle n'est pas significativement affectée par la liaison de ces composés aux protéines plasmatiques car elle ne dépend pas de la concentration, contrairement à la diffusion passive, et elle est rapide. L'équilibre composé X lié ⇔ composé X-libre étant réversible fournit continuellement du composé libre pour ce transport actif. Les ions organiques sont ainsi excrétés dans l'urine par des systèmes de transport actif. La sécrétion des cations a lieu essentiellement au niveau du fragment S_1, celle des anions, principalement au niveau du fragment S_2 (fin de la partie contournée) et S_3 (début de la *pars recta*), (*fig. 3*).



*Si ADH est présente.
Les ions Ca^{++} et Mg^{++} sont également absorbés au niveau des tubules proximaux. Les ions H^+ et ammonium y sont excrétés.

Figure 3. Absorptions et excrétions au niveau du néphron (à l'exception du glomérule)

Les anions et cations organiques sont captés activement à partir du sang dans les cellules tubulaires par des transporteurs actifs exprimés au pôle baso-latéral de ces cellules. Dans le rein humain, les mieux caractérisés sont les transporteurs OAT1 (« Organic Anion Transporter 1 ») et OCT2 (« Organic Cation Transporter 2 »). Ces transporteurs appartiennent à une superfamille appelée « facilitateurs majeurs » dans laquelle est retrouvée de nombreux systèmes de transport transmembranaire touchant aussi bien des xénobiotiques, conjugués ou non, que des composés endogènes (peptides, bases nucléotidiques, ...). Contrairement aux transporteurs appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (« ATP Binding Cassettes »), ces transporteurs sont dépourvus d'activité ATPasique propre et tirent leur énergie d'un couplage avec d'autres transporteurs actifs. Par exemple, OAT1 est un antiport entre anions organiques et acide alpha-cétoglutarique. Ce dernier, produit notamment par le métabolisme mitochondrial, est plus concentré dans le cytosol que dans le sang, sa sortie de la cellule dans le sens de son gradient de concentration fournit l'énergie nécessaire à l'entrée des anions organiques substrats de OAT1. L'alpha-cétoglutarate sanguin est ensuite réimporté dans la cellule tubulaire par un cotransport avec l'ion Na^+, ce qui couple *in fine* OAT1 avec les ATPases membranaires sodium-potassium dépendantes. De nombreux médicaments et toxiques environnementaux sont substrats de ces transporteurs : citons pour les anions organiques l'acide para-amino-hippurique, le probénécide, l'aspirine, les pénicillines, les céphalosporines, la zidovudine, le méthotrexate, l'ochratoxine A ; et pour les cations organiques la quinine, la quinidine, la metformine, la morphine, l'aciclovir, le cisplatine et la cimétidine. Cette multiplicité de substrats peut donner lieu à des mécanismes d'inhibition compétitive. Le probénécide est par exemple un inhibiteur très efficace du transporteur OAT1.
Enfin une néoglucogenèse et la synthèse d'ammoniaque ont lieu dans ces cellules qui sont également riches en glutathion et en glutathion S-transférases.

2. *Pars recta*

Les cellules épithéliales de la *pars recta* S_3 ont des microvilli plus courts et moins de vacuoles apicales, de lysosomes, de mitochondries et de peroxysomes que celles des tubules contournés. La fraction S_3 a une plus forte activité métabolisant les xénobiotiques, une teneur en cytochromes P-450 plus élevée et une plus forte capacité à concentrer les produits chimiques dans les cellules que les parties S_1 et S_2. La prolifération du réticulum endoplasmique lisse, sous l'influence d'inducteurs, se fait surtout en S_3. Ces phénomènes expliquent la plus forte sensibilité de cette région aux néphrotoxiques. L'urée est sécrétée de façon passive au niveau de S_3.

3. Branche descendante et ascendante de l'anse de Henlé

Son épithélium a des perméabilités différentes vis-à-vis de l'eau, de l'urée et des électrolytes (Na^+, Cl^-) : au niveau de la branche descendante se fait un passage passif de l'eau. La perméabilité est faible pour Na^+, Cl^- et l'urée. La branche ascendante est imperméable à l'eau. Le NaCl y est absorbé. L'urée est excrétée au niveau de la partie grêle de la branche ascendante. L'osmolarité augmente dans l'urine à partir de ce niveau. La membrane épaisse de la branche ascendante contient la plus forte

activité ATPasique activée par Na^+ et K^+ et la plus forte densité de mitochondries de tout le néphron. Le NaCl y est fortement réabsorbé.

4. Tubule distal

Un transport actif du Na^+ a lieu à ce niveau. Les ions K^+ sont excrétés dans la partie distale. C'est également à ce niveau que l'acidification de l'urine se fait, favorisant la réabsorption passive de certains xénobiotiques devenant non ionisés. L'eau est réabsorbée si l'hormone antidiurétique (ADH ou vasopressine) est présente.

5. Tube collecteur de Bellini

Il reçoit les tubes contournés distaux de plusieurs néphrons. Les ions Na^+ et Cl^- sont réabsorbés, ainsi que l'eau et l'urée sous l'influence de l'hormone antidiurétique. En son absence, l'urine ne se concentre pas. C'est la diurèse aqueuse ou le diabète insipide.

D. Interstitium

Certaines substances toxiques peuvent se concentrer dans l'interstitium médullaire.

II. Raisons expliquant la susceptibilité du rein aux toxiques

A. Raisons hémodynamiques

Une atteinte fonctionnelle touchant notamment la filtration glomérulaire peut résulter d'une diminution du flux sanguin rénal. Cette situation peut être rencontrée lorsque sont associés des facteurs favorisant la production d'angiotensine II vasoconstrictrice (déplétion sodique, insuffisance cardiaque, cirrhose, diurétiques) et inhibant la synthèse des prostaglandines vasodilatatrices (AINS, aspirine).

B. Raisons toxicocinétiques

Le flux sanguin rénal représente environ 25 % du débit cardiaque, soit 450 ml/min/100 g de tissu représentant globalement un débit d'environ 1,2 l/min pour les deux reins. Ceci entraîne une perfusion très importante touchant notamment le cortex et par conséquent une forte exposition des reins aux xénobiotiques lors des phases initiales de distribution. De plus, certains toxiques s'accumulent spécifiquement dans les cellules tubulaires soit parce qu'ils sont substrats des transporteurs comme OAT1 et OCT2 (céphalosporine, morphine, ochratoxine A, ...), soit en raison de leur affinité pour les protéines (métaux lourds) qui va conduire à leur réabsorption tubulaire. Ces xénobiotiques sont alors susceptibles d'atteindre une concentration toxique au

sein des cellules tubulaires. Il convient de mentionner également le cas particulier des aminosides : ces antibiotiques se lient spécifiquement à la bordure en brosse du pôle apical des cellules tubulaires, ce qui entraîne une désorganisation de cette membrane et, par le mécanisme d'endocytose, leur accumulation intracellulaire dans la membrane des lysosomes.
Enfin, il convient de mentionner que la réabsorption d'eau dans les tubules et l'acidification progressive de l'urine peut conduire à la précipitation des xénobiotiques acides faibles (sulfamides, antiviraux, oxalates, ...), précipitation qui peut conduire à une insuffisance rénale obstructive. De façon indirecte, le même effet toxique est la conséquence des phénomènes d'hémolyse ou de rhabdomyolyse en raison de la précipitation dans le tubule de l'hémoglobine ou de la myoglobine.

C. Raisons métaboliques

Les cellules tubulaires de la région S3 sont douées d'une capacité importante de métabolisme des xénobiotiques. Elles expriment des cytochromes P450 comme le CYP1A1, le CYP2E1 et le CYP3A5 qui sont susceptibles de générer des métabolites électrophiles toxiques entraînant, comme dans le foie, une toxicité directe ou une toxicité de type immunoallergique.
Une particularité est l'expression par les cellules tubulaires proximales de l'enzyme mitochondriale β-lyase capable de transformer les dérivés conjugués à la cystéine, issus de la dégradation des conjugués au glutathion, en espèces radicalaires $R\text{-}S^{\bullet}$. Cette enzyme serait responsable de la toxicité tubulaire des alcènes polyhalogénés comme l'hexachlorobutadiène ou le trichloréthylène.
Les capacités métaboliques du rein ne sont pas restreintes aux seules cellules tubulaires. Ainsi les cellules médullaires expriment fortement la prostaglandine H synthase (PHS), une enzyme capable de catalyser des réactions de co-oxydation des xénobiotiques générant des métabolites électrophiles toxiques. Les dérivés phénoliques comme le paracétamol sont particulièrement susceptibles d'être activés dans le rein par cette voie particulière.

D. Toxiques mitochondriaux

Les cellules tubulaires présentent de très nombreuses mitochondries en raison des besoins énergétiques générés par les mécanismes actifs de sécrétion ou de réabsorption ainsi que de leur métabolisme intense. Cette particularité explique l'extrême sensibilité du rein aux toxiques mitochondriaux comme les métaux lourds ou les découpleurs de phosphorylation oxydative comme l'herbicide DNOC (dinitro-orthocrésol).

E. Toxiques glomérulaires

Les complexes immuns circulants peuvent être déposés et séquestrés dans le glomérule rénal, entraînant la survenue d'une glomérulonéphrite. Les sels d'or et la D-pénicillamine sont les médicaments les plus fréquemment en cause.

III. Compensation des dommages rénaux

Le rein a une remarquable capacité de régénération. Peu de temps après une néphrectomie, le rein épargné s'hypertrophie et aucun signe biologique classique ne permet de soupçonner la perte d'un rein. Cette capacité de récupération devient un problème quand on essaye d'évaluer l'effet d'un néphrotoxique. Une seule dose d'un néphrotoxique peut entraîner des effets aigus dans les fonctions rénales, mais si la dose n'est pas mortelle, le rein peut compenser et récupérer ses fonctions normales au bout d'un temps court. Une administration chronique d'une faible dose de néphrotoxique peut entraîner des changements significatifs de la structure rénale, mais au cours de l'administration le rein peut compenser et des changements significatifs ne seront pas détectables lors de la mise en œuvre des tests fonctionnels du rein jusqu'au moment où les capacités de compenser seront débordées. Le sujet peut alors brusquement présenter un dysfonctionnement gravissime.

IV. Manifestations cliniques de la néphrotoxicité

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) se manifeste par la survenue d'une oligurie ou d'une anurie. L'origine peut être tubulaire (aminosides, métaux lourds, anticancéreux, produits de contraste iodés), tubulo-interstitielle (β-lactamines, AINS, selon un mécanisme généralement immunoallergique) ou obstructive (sulfamides, indinavir, aciclovir, méthotrexate, oxalates).

Une insuffisance rénale chronique tubulo-interstitielle se manifeste en premier lieu par la survenue de troubles biologiques : augmentation de la créatininémie et désordres hydro-électrolytiques. Analgésiques et sels de lithium sont les médicaments les plus fréquemment responsables.

La glomérulonéphrite toxique par dépôt de complexes immuns se traduit par la survenue d'un syndrome néphrotique associant œdème généralisé et fuite protéique s'accompagnant parfois d'une hématurie.

V. Exploration de la fonction rénale

Nous ne ferons que résumer l'exploration de la fonction rénale traitée dans le tome 2. Elle doit se faire sur l'urine et sur le sang. Elle fait appel à des explorations statiques et dynamiques. Parmi les très nombreuses épreuves et méthodes proposées, nous ne donnerons que celles qui sont couramment utilisées.

A. Exploration statique sur l'urine

1. Protéinurie

On trouve entre 50 et 100 mg par jour de protéines urinaires totales chez le sujet sain. Cette protéinurie physiologique concerne environ pour moitié les protéines

de faible masse moléculaire provenant du plasma ainsi que des glycoprotéines provenant du catabolisme des membranes du néphron. Leur analyse quantitative se fait par électrophorèse sur acétate de cellulose ou sur gel de polyacrylamide de l'urine concentrée. Les atteintes glomérulaires augmentent le taux de filtration et le mécanisme de réabsorption, qui est saturable, est débordé.
On en trouve de l'ordre de 3 g par jour et plus dans l'urine dans le syndrome néphrotique ou la glomérulonéphrite aiguë. Des atteintes glomérulaires peuvent être annoncées très tôt par la présence de faibles traces d'albumine, dite « microalbuminurie ». Ce sont essentiellement les protéines de masse moléculaire supérieure à 70 000 Da qui sont retrouvées dans l'urine. Dans les atteintes tubulaires pures, seul le mécanisme de réabsorption est perturbé et la protéinurie ne dépasse pas 200-300 mg/L. Ce sont essentiellement des protéines de masse inférieure à 70 000 Da que l'on retrouve dans l'urine (β2 microglobuline, chaînes légères des immunoglobulines, protéine liant le rétinol, lysozyme, etc.).

2. Enzymes urinaires

L'atteinte spécifique de certaines parties ou de certains organites des cellules tubulaires proximales peut être mise en évidence par l'excrétion urinaire d'enzymes. L'origine de ces enzymes est indiquée dans le *tableau 1*. Tous ces enzymes ne sont évidemment pas recherchés systématiquement. Les mesures d'activité de leucine aminopeptidase, de phosphatase alcaline, de γGT, de NAG et de lactate déshydrogénase sont les plus couramment effectuées.

Tableau 1. Origine des enzymes de cellules tubulaires proximales

Enzymes membranaires de la bordure en brosse : Leucine aminopeptidase γ-Glutamyl transférase (γGT) Phosphatase alcaline	Enzymes habituellement testés
Alanine aminopeptidase Cathepsine Dipeptidyl-peptidase Enzyme de conversion de l'angiotensine Maltase Glutamine synthétase	Enzymes plus rarement testés
Enzymes des lysosomes des cellules tubulaires : N-acétyl-glucosaminidase (NAG)	Enzyme habituellement testé
β-D-galactosidase* Muraminidase (lysozyme)** Arylsulfatase Glucose-6-phosphatase et phosphorylase α-L-Fucosidase Phosphatase acide	Enzymes plus rarement testés
Enzymes cytosoliques : Lactate déshydrogénase β-D-glucosidase	Enzymes habituellement testés
Phosphohexose isomérase Glutathion-S-transférase	Enzymes plus rarement testés
Enzymes des mitochondries : Glutamate déshydrogénase	

*Cet enzyme a une activité β-D-galactosidasique à pH6.
**L'altération de la réabsorption tubulaire peut empêcher celle du lysozyme d'origine sanguine filtré au niveau du glomérule.

3. Sédiments urinaires

D'après Fent *et coll.*, 1988, toute évaluation d'atteinte rénale devrait comprendre l'examen du sédiment urinaire, la présence de cellules et de cylindres étant l'indicateur le plus sensible de cette atteinte. Les éléments minéraux cristallisés apportent en général peu d'informations, sauf la cystine dont la présence indique le plus souvent une tubulopathie. Des cristalluries médicamenteuses sont possibles chez des malades traités aux antibiotiques ou antibactériens dont les sulfamides. Les cylindres hyalins constitués de protéines qui ont été moulées dans les tubules et les cellules sont des témoins de l'atteinte de l'appareil urinaire. Les cylindres granuleux sont tapissés soit de cellules épithéliales ou de gouttelettes de graisses (cas de lésions tubulaires), soit de globules rouges (cas des glomérulonéphrites). Quant aux cellules épithéliales, elles peuvent provenir de toutes les parties de l'arbre urinaire.

4. Composés azotés non protéiques

La créatinine est éliminée dans l'urine d'une manière constante et indépendante de l'alimentation (par jour en moyenne de 0,18 mmol/kg chez l'homme et de 0,16 mmol/kg chez la femme). On rapporte souvent le taux d'excrétion des constituants urinaires à celui d'une mmole de créatinine.

5. Glucosuries, aminoaciduries et phosphaturies

La glucosurie peut signer, en plus du diabète, une atteinte tubulaire entraînant un défaut de réabsorption. L'apparition d'une aminoacidurie globale ou une phosphaturie signent également une atteinte tubulaire d'origine proximale.

B. Exploration sur le sang

L'insuffisance rénale empêche la concentration de substances comme l'urée ou la créatinine dans les urines et conduit à leur augmentation dans le sang.

1. Créatininémie

Une concentration plasmatique en créatinine supérieure à 120 µmol/l (14 mg/L) est déjà une indication d'une insuffisance rénale.

2. Urémie

De nombreux facteurs extra-rénaux peuvent faire varier l'urée plasmatique. De plus, dans les néphropathies organiques, son augmentation est tardive. Une valeur supérieure à 9 mmol/L signe cependant une altération rénale.

3. Ionogramme sanguin

Parfois une atteinte tubulaire provoque des perturbations de l'ionogramme sanguin (hyponatrémie, hyper ou hypokaliémie, hypocalcémie, diminution des taux sanguins de bicarbonates et de phosphates).

C. Exploration dynamique

L'étude des clairances rénales permet d'explorer le fonctionnement des différentes parties des néphrons. Rappelons que la clairance rénale d'une substance est égale au rapport entre le débit urinaire par minute de cette substance (concentration urinaire × volume urinaire) et sa concentration plasmatique (P).
C'est donc le volume virtuel de plasma débarrassé de la substance en une minute. Il mesure donc l'efficacité d'épuration du rein. On choisit pour mesurer la clairance des substances qui ne se lient pas aux protéines plasmatiques et ne sont ni stockées, ni métabolisées dans l'organisme, ni éliminées par voie extra-rénale.

1. Clairance glomérulaire ou débit de filtration glomérulaire

Pour effectuer cette mesure, on utilise des substances qui sont uniquement filtrées au niveau du glomérule et ne sont donc ni excrétées, ni réabsorbées au niveau des tubules. L'inuline, le mannitol et le thiosulfate sont utilisables, mais la méthode est peu pratiquée car elle nécessite une perfusion intraveineuse pour obtenir un taux plasmatique constant. La créatinine endogène, quoiqu'un peu sécrétée au niveau des tubules, surtout en cas de concentration plasmatique élevée, est la substance dont la clairance est le plus souvent mesurée. Son abaissement est un des signes les plus sensibles d'une atteinte de la filtration glomérulaire (valeur normale 126 ± 20 mL/min). Cependant, quand la concentration plasmatique s'élève, il n'existe plus de corrélation linéaire entre cette concentration et le débit de filtration glomérulaire, ou GFR (« *Glomerular Filtration Rate* »).
La clairance de l'urée est un mauvais reflet du débit de filtration glomérulaire.

2. Clairance tubulaire

On détermine la capacité tubulaire maximale de réabsorption ou d'excrétion (Tm).

a) Mesure de la réabsorption tubulaire

Pour mesurer la réabsorption, on utilise le glucose. Pour ce faire, on élève la glycémie à 5 fois sa valeur physiologique, ce qui dépasse la capacité de réabsorption des tubules. La quantité de glucose filtré (que l'on peut obtenir en multipliant la glycémie par le volume du filtrat glomérulaire évalué par la clairance de la créatinine endogène ou du mannitol), diminuée de la quantité de glucose éliminé dans l'urine par unité de temps, permet de calculer la Tm du glucose.

b) Mesure de la sécrétion tubulaire et mesure du flux plasmatique rénal

L'acide paraaminohippurique (PAH) a une élimination rénale qui dépend de la dose administrée. À faible dose (concentration plasmatique inférieure ou égale à 0,2 mm), il est entièrement fixé aux protéines plasmatiques, donc pratiquement pas filtré et totalement extrait du plasma en un seul passage par sécrétion tubulaire proximale.
La clairance du PAH mesure donc également le flux plasmatique rénal (FPR, normalement de 600 mL/min). Connaissant l'hématocrite, on obtient le flux sanguin rénal. On a FPR = Cl. PAH/E (E = coefficient d'extraction du PAH, varie entre 0,9 et 1,0 chez l'homme normal).

L'épreuve à la phénolsulfonephtaléine (PSP) explore la sécrétion tubulaire proximale. Après injection IV de PSP, on détermine l'élimination urinaire du produit. Cette épreuve peut être perturbée par plusieurs causes comme les affections hépatiques et la néphrose lipoïdique.

c) Exploration de l'anse de Henlé et du tubule distal

La polydipsie et la polyurie font soupçonner la diminution de la concentration de l'urine que l'on peut mettre en évidence par l'étude de la réponse urinaire, soit à la restriction des apports hydriques, soit à l'administration d'hormone antidiurétique. L'épreuve d'acidification au NH_4Cl permet d'explorer les troubles de la fonction de l'acidification qui peuvent apparaître dans certaines néphropathies toxiques. Une épreuve d'alcalinisation par une surcharge en bicarbonate avec étude de sa clairance rapportée à celle de la créatinine permet de mettre en évidence des atrophies tubulaires proximales et distales.

VI. Principales substances néphrotoxiques

A. Médicaments

1. Antibiotiques

Plusieurs antibiotiques sont néphrotoxiques. Ils sont responsables de la moitié environ des néphropathies iatrogènes. La plupart sont dues aux aminosides ou à des associations de celles-ci avec des céphalosporines ou des polymyxines.
Les aminosides, sous forme cationique dans l'urine, se lient aux phospholipides de la bordure en brosse des cellules tubulaires, puis, par un phénomène d'endocytose, gagnent la membrane lysosomiale. L'histologie montre d'abord des lésions du lysosome, puis de la bordure en brosse du réticulum endoplasmique, des mitochondries, tout ceci conduisant à la nécrose des tubules proximaux. Il est fréquent d'observer une prolifération des cellules des tubules proximaux. Comme avec d'autres toxiques, un facteur critique de la toxicité est la persistance de ces toxiques dans les cellules cibles. Ainsi, la gentamicine a une demi-vie de 5 à 6 jours dans le rein. En revanche, on ne trouve plus trace de streptomycine après 24 heures, ce qui va de pair avec sa très faible néphrotoxicité.
La néphrotoxicité des aminosides, très insidieuse, se caractérise par une néphropathie non oligurique avec un débit de filtration glomérulaire réduit, une augmentation de la créatininémie et de l'urémie. La polyurie est le signe le plus précoce et semble due à l'inhibition du transport des ions Cl^- dans la branche ascendante de l'anse de Henlé. Au bout de 24 heures, on observe une enzymurie (enzymes de la bordure en brosse), une glucosurie, une protéinurie et une aminoacidurie. L'IRA survient dans un délai de 7 à 10 jours, elle nécessite fréquemment une épuration extra rénale d'une durée moyenne de 15 jours.
Il existe des facteurs de risque reconnus : l'association avec d'autres médicaments néphrotoxiques ou avec des diurétiques, le patient cirrhotique ou le sujet agé.

Les céphalosporines, surtout de première génération comme la céfaloridine, provoquent également une atteinte tubulaire proximale. Cet antibiotique substrat des transporteurs d'anions organiques s'accumule dans les cellules tubulaires proximales notamment dans le segment S2. Les CYP métabolisent ensuite la céphaloridine en un métabolite réactif responsable d'un phénomène de peroxydation lipidique. La néphrotoxicité de la céfaloridine est faible ou inexistante chez le nouveau-né car le système de transport est peu développé, ainsi la céfaloridine est-elle peu concentrée dans le tubule et n'atteint pas le seuil toxique.
Les polymyxines, comme la colistine et la polymyxine B, ont des effets similaires aux aminoglycosides, surtout en association avec les céphalosporines.
L'amphotéricine B est un antifongique. Sa néphrotoxicité est liée à son accumulation dans le rein avec à la fois des effets hémodynamiques et tubulaires. La néphrotoxicité s'observe pour des doses cumulées supérieures à 1 g. Elle est caractérisée par une polyurie qui résiste à l'hormone antidiurétique ADH, une acidose tubulaire, une hypokaliémie conduisant à une insuffisance rénale aiguë ou chronique. C'est un néphrotoxique qui touche toutes les parties du néphron, car il altère les fonctions glomérulaires (GFR abaissée par suite de constriction des artérioles rénales), mais aussi par ses propriétés de ionophore celles des tubules proximaux (fuite de K^+ vers l'urine) et distaux (acidification de l'urine et blocage de l'effet de l'ADH).
La méticilline, la pénicilline et la rifampicine peuvent provoquer des néphropathies interstitielles aiguës immunoallergiques avec présence d'éosinophiles dans le sang et dans l'urine. Ce type d'intoxication ne se produit qu'après une période de latence et conduit à un syndrome néphrotique avec fuite protéique qui entraîne une hypoprotéinémie favorable à l'installation d'oedèmes.
Les sulfamides comme la sulfapyridine ou le sulfaméthoxazole peuvent provoquer une obstruction tubulaire par formation de cristaux.

2. Produits de contraste iodés

Les produits de contraste triiodés hydrosolubles uro-angiographiques arrivent en seconde position parmi les médicaments provoquant des insuffisances rénales aiguës. Dans un cas sur deux l'insuffisance est sévère, nécessitant une épuration extra-rénale. Le taux élevé de décès tient au retard quasi constant du diagnostic, ces examens étant pratiqués en ambulatoire. Les facteurs responsables de l'IRA sont l'hyperosmolarité et le fort pouvoir vasoconstricteur des produits utilisés, des phénomènes immunoallergiques et une toxicité directe sur le tubule rénal. Les produits de contraste iodés plus récents, de faible osmolarité ou non ioniques, sont moins néphrotoxiques.

3. Anticancéreux

Le cisplatine est le plus néphrotoxique des anticancéreux. L'atteinte prédomine dans la *pars recta*, mais le cisplatine lèse également les tubules distaux et les tubes collecteurs. Une polyurie caractérise cette intoxication avec perte d'ions Mg^{++} qui entraîne secondairement une tétanie. L'isomère trans et le carboplatine ne sont pas néphrotoxiques, un métabolite du cis-platine, plutôt que l'atome de

platine lui-même, serait donc responsable de sa néphrotoxicité. Le cisplatine entraîne une nécrose tubulaire aiguë qui peut persister dans certains cas et être associée à une néphrite interstitielle avec insuffisance rénale chronique irréversible. Afin de limiter cette néphrotoxicité, l'administration de cisplatine s'accompagne d'un protocole d'hyperhydratation par voie parentérale qui permet de diluer le métabolite toxique.
La mitomycine C exerce un effet toxique sur les cellules endothéliales et mésangiales du glomérule. Elle peut déclencher un syndrome hémolytique et urémique et une insuffisance rénale définitive.
La streptozocine, les nitrosourées et le céliptium peuvent être responsables de néphrites interstitielles chroniques (NIC). Dans ces deux derniers cas, la NIC peut évoluer vers l'insuffisance rénale chronique (IRC) terminale.

4. AINS et antalgiques

Tels que l'aspirine, l'ibuprofène, le naproxène et l'indométacine, ils sont très largement utilisés comme analgésiques et anti-inflammatoires. Ce sont des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines.
Ils présentent trois types différents de néphrotoxicité :
- insuffisance rénale aiguë survenant quelques heures seulement après administration d'AINS par suite d'une réduction importante de la GFR avec oligurie. Le mécanisme de cette pathologie est la vasoconstriction consécutive à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines car l'effet de l'angiotensine II et des catécholamines vasopressives devient prépondérant ;
- néphrite interstitielle caractérisée par un œdème interstitiel diffus avec infiltration de cellules inflammatoires. Les malades présentent une protéinurie et une hypercréatininémie. À l'arrêt du traitement, la fonction rénale s'améliore en 1 à 3 mois ;
- insuffisance rénale chronique, souvent irréversible, caractérisée par une nécrose papillaire et une néphrite interstitielle. Le mécanisme de la pathogenèse n'est pas bien connu, mais il s'agirait d'une ischémie papillaire consécutive à une vasoconstriction. Cela pourrait aussi être dû à la production de métabolites réactifs par cooxydation par la prostaglandine H synthase (PHS), entraînant une lyse de ces cellules et une nécrose. À forte dose, le paracétamol peut induire par ce même mécanisme une insuffisance rénale qui reste généralement asymptomatique.

5. Immunosuppresseurs

La ciclosporine et le tacrolimus entraînent une néphrotoxicité qui peut se traduire par :
- une insuffisance rénale aiguë réversible due à une vasoconstriction des artérioles préglomérulaires ;
- une vasculopathie aiguë affectant les artérioles et les capillaires glomérulaires ;
- une insuffisance rénale chronique due à une fibrose interstitielle conduisant à la sclérose glomérulaire et l'atrophie tubulaire.

L'origine de cette néphrotoxicité est liée à la cible pharmacologique de ces molécules : l'inhibition de la protéine phosphatase calcineurine dans les cellules endothéliales

entraîne des modifications d'expression de gènes comme le *TGFβ*, ce qui induit une vasoconstriction et une réaction de fibrose. Ces lésions touchent 20 à 40 % des patients, elles peuvent être irréversibles. Ces produits ne doivent pas être associés à d'autres médicaments néphrotoxiques, notamment les aminosides.

6. Antiviraux

L'indinavir et l'aciclovir peuvent précipiter dans le tubule, entraînant la survenue d'une insuffisance rénale obstructive.

7. Sels de lithium

Ils ont une toxicité sur le tube distal. Elle se traduit par une néphrite interstitielle chronique. Ces anomalies rénales ne surviennent habituellement qu'après 5 à 10 années de traitement.

B. Toxiques environnementaux et alimentaires

1. Métaux Lourds

La plupart des métaux lourds sont néphrotoxiques, d'une part en raison de leur cinétique qui entraîne une accumulation dans les cellules tubulaires, d'autre part en raison de leur effet vasoconstricteur et de leur toxicité cellulaire qui s'exerce sur la mitochondrie, le lysosome et le réticulum endoplasmique. L'effet thioloprive et l'inhibition de nombreuses enzymes, comme les ATPases, qui en résulte jouent un rôle important dans cette toxicité cellulaire.
Les ions mercuriques ont une forte affinité pour les groupements – SH. Leur effet toxique porte d'abord sur le fragment S3 du tube proximal, puis avec l'augmentation des doses ou la durée de l'intoxication, S1 et S2 peuvent être affectés. Les ions mercuriques entraînent la perte de la bordure en brosse, puis des altérations dans la morphologie et le fonctionnement des mitochondries. Il s'ensuit une nécrose des tubes proximaux. Des doses supérieures à 500 mg de $HgCl_2$ conduisent à une insuffisance rénale sévère en 12 à 48 h. Une exposition chronique aux ions mercuriques peut conduire à une glomérulonéphrite membranaire d'origine immunologique.
Le cadmium est excrété dans l'urine, essentiellement sous forme d'un complexe avec la métallothionéine. Celui-ci est activement réabsorbé au niveau des tubules proximaux (S1 et S2) et, une fois dans la cellule, le cadmium est libéré et y exerce ses effets toxiques, en particulier sur les lysosomes, mais aussi sur les mécanismes de transmission des signaux cellulaires. Il a une demi-durée de vie très longue dans le rein, de 20 à 30 ans. La conséquence est une néphrite interstitielle chronique. L'exposition chronique au cadmium conduit à une tubulopathie proximale qui peut s'accompagner d'une discrète glomérulopathie.
Les ions Pb^{++} sont rapidement absorbés par les cellules des tubules proximaux où ils endommagent les mitochondries. Des complexes entre le plomb et des protéines acides apparaissent sous forme de ponctuations acidophiles dans les noyaux des cellules épithéliales. Ces granulations sont visibles avant les signes d'intoxication.

Leur formation serait en fait une détoxication du plomb. Des complexes entre le plomb et des protéines cytosoliques ont également été décrits. Le syndrome rénal est celui d'une néphrite interstitielle chronique (NIC).

2. Dérivés halogénés

Le Tétrachlorure de carbone et chloroforme sont à la fois hépatotoxiques et néphrotoxiques. L'atteinte porte essentiellement sur les cellules tubulaires proximales. Ce sont des métabolites réactifs, formés dans les reins par le CYP2E1, qui sont responsables de la toxicité.

Le tétrafluoroéthylène et l'hexachlorobutadiène produisent des lésions au niveau de S3, les mitochondries étant les organites cibles. Nous avons discuté plus haut du mécanisme de cette néphrotoxicité.

En plus de leur hépatotoxicité, le bromobenzène et d'autres dérivés halogénés du benzène sont néphrotoxiques. Le bromobenzène doit d'abord être oxydé dans le foie en bromophénol, puis en bromohydroquinone qui est conjuguée par deux molécules de glutathion ce qui augmente de 1 000 fois sa néphrotoxicité. Après transport au niveau des reins et hydrolyse en dérivé cystéine-conjugué, il y a ici également intervention des β-lyases dans la formation des dérivés réactifs.

3. Acides aristolochiques

De nombreux travaux ont montré des relations entre les néphropathies interstitielles d'étiologie indéterminée et certaines substances naturelles utilisées en thérapeutique. C'est le cas de la néphropathie aux herbes chinoises décrite initialement en Belgique, responsable d'insuffisance terminale chez des jeunes femmes suivant un régime amaigrissant à base d'herbes chinoises. On sait maintenant que cette néphropathie est en rapport avec l'acide aristolochique contenu dans une plante, *Aristolochia fangchi*, délivrée à la place de *Stephania tetrandra* ou mélangée à cette dernière (Vanhaelen *et coll.*, 1994, Vanherweghen *et coll.*, 1996). Cette néphropathie interstitielle chronique est si sévère que de nombreux malades ont dû être transplantés. Lors de ces transplantations, des tumeurs rénales ont été découvertes chez certaines patientes. Des cas, dont certains mortels, ont depuis été décrits en France.

4. Mycotoxines

Les mycotoxines sont produites par diverses moisissures et peuvent contaminer la nourriture de l'homme et des animaux domestiques. Plusieurs mycotoxines sont néphrotoxiques, par exemple la rubratoxine B, l'aflatoxine B1 et la stérigmatocystine, la fumonisine B, l'ochratoxine A et la citrinine. Ces deux dernières sont responsables de tubulonéphrites chez le porc. De plus, ces mycotoxines, seules ou en association, sont très vraisemblablement en partie responsables de la néphropathie endémique des Balkans qui sévit chez les populations rurales isolées de Bulgarie, Yougoslavie et Roumanie. L'ochratoxine A est à la fois substrat et inhibiteur des transporteurs OAT ce qui permet son accumulation dans les cellules tubulaires.

Cette mycotoxine inhibe la synthèse des protéines par compétition vis-à-vis de la phénylalanine. Il y a synergie entre l'ochratoxine A et la citrinine dans l'inhibition de la synthèse des macromolécules. De plus, l'ochratoxine A est génotoxique et la citrinine est mutagène. L'une ou l'autre, ou les deux associées, pourraient être responsables des cancers des reins et des voies urinaires supérieures souvent associés à l'étape terminale de la néphropathie humaine.

5. Pesticides

Les herbicides 2,4,5-T, diquat et paraquat sont puissamment néphrotoxiques. Ces deux derniers, qui sont également hépatotoxiques, induisent une tubulopathie aiguë.

6. Éthylène-glycol

Ce produit, largement utilisé comme antigel, est métabolisé en oxalates qui peuvent précipiter dans le tubule et induire une insuffisance rénale obstructive.

7. Cancérogènes rénaux

Des tumeurs rénales, principalement des adénocarcinomes, peuvent être provoquées par de nombreuses substances : hydrocarbures aromatiques polycycliques, amines aromatiques comme l'α et la β-naphtylamines, nitrosamines, métaux lourds comme le Pb et le Cd, acides aristolochiques. L'ochratoxine A, qui est capable d'induire des tumeurs rénales chez l'animal, est soupçonnée d'être un cancérogène rénal humain. Cette mycotoxine est fréquemment retrouvée dans les produits à base de céréales, dans lesquels sa teneur est réglementée.

VII. Méthodes d'étude de la néphrotoxicité

Les principaux modèles animaux utilisés pour l'étude de la néphrotoxicité sont le rat, le chien et le lapin. Lors de ces études, les marqueurs biologiques comme la créatininémie, l'urémie et l'ionogramme sanguin sont utilisés pour dépister une éventuelle insuffisance rénale. Après sacrifice des animaux, l'analyse est macroscopique (poids et aspect des reins) et microscopique. Cette dernière comporte une étude histologique classique après réalisation de coupes et coloration, mais également une analyse en microscopie électronique des cellules tubulaires qui permet de décrire l'aspect des bordures en brosse, des mitochondries et des lysosomes.
Les coupes épaisses de reins permettent l'étude des flux des ions organiques, des sucres, acides aminés, bases et électrolytes.
Les néphrons isolés microdisséqués ou les tubules rénaux perfusés constituent des modèles alternatifs plus rarement utilisés.
In vitro, la cytotoxicité peut être évaluée sur des tubules rénaux en suspension ou sur des cellules en culture comme les cellules mésangiales.

L'essentiel de la question

L'étiologie de nombreuses néphropathies est encore inconnue et pourrait être due à des médicaments ou des toxiques de l'environnement seuls ou en association (mycotoxines + métaux lourds, analgésiques ou AINS + mycotoxines, analgésiques ou AINS + métaux lourds).
Les toxiques pouvant entraîner différentes formes de néphropathie sont nombreux, on peut citer : les métaux lourds (mercure, cadmium, cis-platine), des dérivés halogénés, des médicaments (analgésiques, AINS, antibiotiques) des produits de contraste iodés, les herbes chinoises, la ciclosporine, des mycotoxines.
Il semble également qu'il existe des populations à risque : des sujets appartenant à certains groupes HLA sont plus susceptibles que d'autres de faire des glomérulonéphrites par dépôt de complexes anticorps-antigènes. Parmi les autres facteurs de risque de néphropathie iatrogène, il faut signaler l'insuffisance rénale chronique préexistante, l'âge supérieur à 60 ans, l'athérosclérose, le diabète, la goutte, le myélome. Pour pouvoir prévenir les néphropathies toxiques, en particulier médicamenteuses, il faudrait pouvoir disposer de marqueurs biologiques précoces. Un diagnostic précoce est en effet important pour pouvoir agir sur la cause de la néphropathie. Enfin, il est important de faire des dosages répétés dans le temps, des constituants urinaires et sanguins pour ne pas manquer le diagnostic d'une néphropathie compensée.

Pour en savoir plus

- Fillastre P, Druet P, Mery J Ph. Proteinuric nephropathies associated with drugs and substances of abuse. Dans : Cameron JS ; Glassock RJ eds. The nephrotic syndrom. New York, Basel : Marcel Dekker, Inc 1998 : 697-744.
- Isnard-Bagnis C, Moulin B, Launay-Vacher V, Izzedine H, Tostivint I, Deray G. Toxicité rénale des anticancéreux. Néphrologie & Thérapeutique 2005 ; 1 : 101-114.
- Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific Organic Cation Transporters : Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. Pharmaceutical Res 2007 ; 24,7, 1227-1251.
- Pfohl-Leszkowicz A. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Technique et Documentation, Paris, 1999.
- Schnellmann RG. Toxic responses of the kidney. Dans : « Casarett and Doull's Toxicology : The basic science of poisons ». CD Klaassen, MO Amdur et JD Doull eds, 7e édition, Mc Graw-Hill New York 2001 : 491-514.
- Van Aubel RAMH., Masereeuw R, Russel FGM. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. Am J Physiol Renal Physiol 2000 ; 279 : F216-F232.
- Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherwhegem J.-L. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs, Lancet 1994 ; 343 : 174.
- Vanherweghem JL, Abramovicz D, Tielemans C, Depierreux M. Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis : a pilot study in chinese herbs nephropathy. Am J Kidney Diseases 1996 ; 27,2 : 209-215.

Mécanismes et manifestations de l'action toxique au niveau cardiovasculaire

M. THEVENIN, Laboratoire de Toxicologie, Faculté de pharmacie, Paris V.

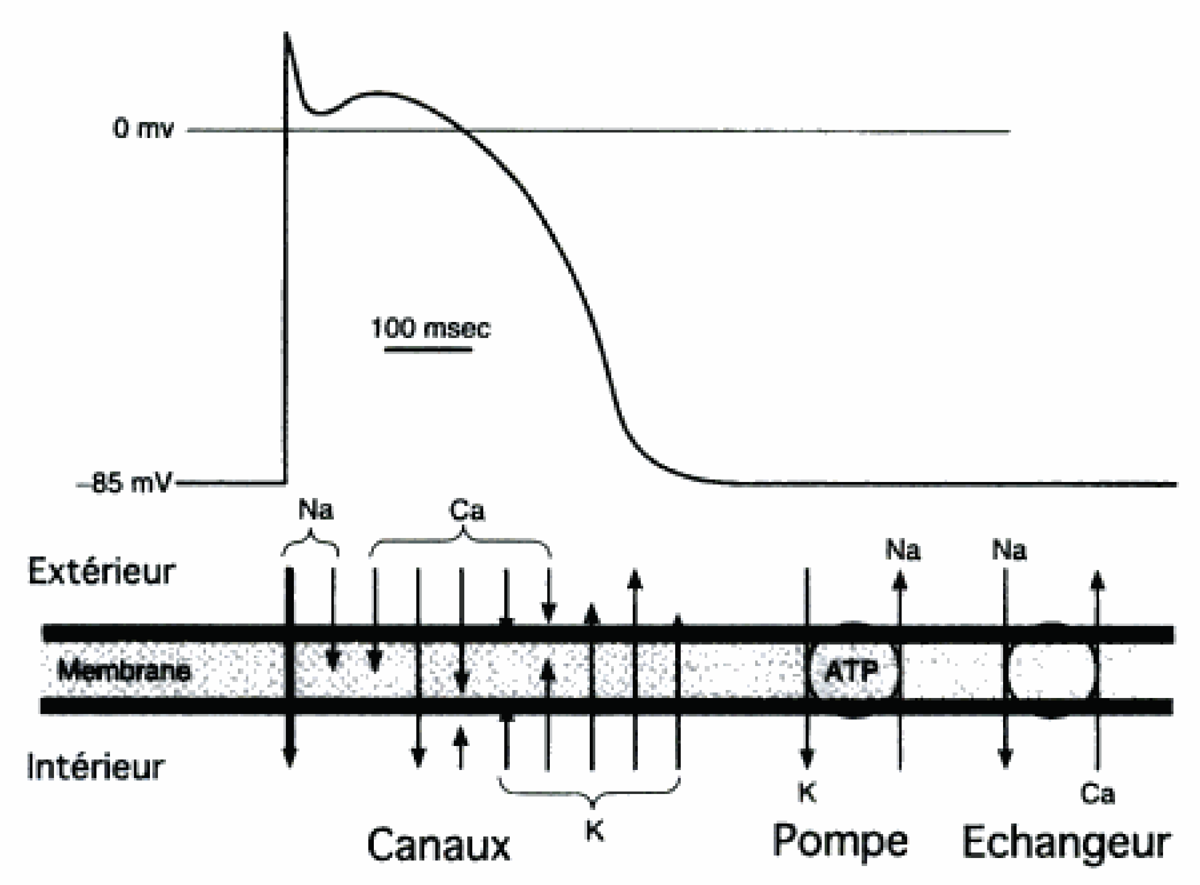
De nombreux xénobiotiques, médicaments, produits industriels ou produits naturels, présentent une toxicité potentielle vis-à-vis du système cardiovasculaire.
Les caractéristiques essentielles des lésions observées sont les suivantes :
- *elles peuvent atteindre sélectivement le cœur ou les vaisseaux ;*
- *elles sont souvent purement fonctionnelles sans retentissement morphologique, réversibles ou non en fonction de la dose et de la durée d'exposition, d'intensité en général dose-dépendante ;*
- *elles peuvent également être morphologiques, de type dégénératif ou inflammatoire, susceptibles d'apparaître après une seule exposition, avec un éventuel retentissement fonctionnel ;*
- *elles sont primitives, généralement à la suite d'un surdosage d'un médicament à visée cardiovasculaire entraînant une réponse pharmacologique excessive ;*
- *mais le plus souvent, elles sont secondaires à l'atteinte d'autres organes par des toxiques n'ayant pas d'action cardiaque directe. L'atteinte cardiovasculaire ne constitue alors qu'un effet secondaire de l'intoxication.*

Si le rôle des xénobiotiques est bien établi dans le développement des lésions cardiovasculaires aiguës, il n'est par contre que très partiellement connu dans celui des maladies cardiovasculaires chroniques (par exemple, hypertension, athérosclérose).
Les mécanismes invoqués dans la toxicité cardiovasculaire sont :
- *directs : perturbations au niveau de fonctions membranaires tels que transports ioniques, systèmes contractiles, systèmes fournisseurs d'énergie...*
- *indirects : toute hypoxie, tout déséquilibre hydroélectrolytique ou acido-basique peut être à l'origine d'un effet cardiovasculaire ;*
- *ou encore de nature immunologique.*

I. Rappels

A. Rythme cardiaque

La contraction cardiaque dépend de la naissance spontanée puis de la propagation d'une onde de dépolarisation cellulaire qui apparaît dans le nœud sino-auriculaire (SA) (Keith-Flack), véritable *pacemaker* cardiaque. La décharge spontanée du nœud SA signifie qu'il y a un automatisme du muscle cardiaque. Cette onde envahit le myocarde auriculaire et gagne le nœud auriculo-ventriculaire (Tawara), où elle subit un net ralentissement, responsable du temps qui sépare les contractions auriculaires des contractions ventriculaires. L'onde de dépolarisation parcourt ensuite rapidement le faisceau de His et ses deux branches, le réseau de Purkinje et gagne l'intimité du myocarde ventriculaire. La propagation unidirectionnelle de l'onde de dépolarisation à l'état physiologique s'explique par l'existence de périodes réfractaires pendant lesquelles la cellule n'est plus excitable.
L'électrophysiologie cardiaque dépend des mouvements ioniques transmembranaires (par l'intermédiaire de canaux, de systèmes d'échanges ioniques, de pompes ioniques), dépolarisants lorsqu'ils se produisent dans le sens milieu extracellulaire vers milieu intracellulaire, et repolarisants en sens inverse, à l'origine d'un potentiel d'action (*fig. 1*).



Source : B.G. Katzung, Basic and clinical pharmacology. Appleton & Lange, 1995.

Figure 1. Potentiel d'action et transferts ioniques transmembranaires

L'innervation végétative contrôle l'électrophysiologie cardiaque en jouant à la fois sur la fréquence des ondes de dépolarisation au niveau du nœud sinusal et sur la vitesse de leur passage aux ventricules.

B. Arythmies

Le rythme cardiaque normal (adulte = 60-70/minute au repos, enfant = 100-120/minute) est produit par l'influx normal du nœud SA qui se propage vers les autres secteurs de façon coordonnée. Le rythme du nœud SA s'impose à l'ensemble du tissu cardiaque. Dans certaines circonstances, le rythme du nœud SA peut se modifier ou des influx peuvent se produire à partir d'autres régions (dans le tissu conducteur ou dans les cellules myocardiques contractiles), shuntant ainsi le nœud SA. Ceci modifie la coordination des battements cardiaques, ce qui implique la survenue de troubles du rythme ou arythmies, désordres fonctionnels allant des extrasystoles simples à la fibrillation ventriculaire et à l'arrêt cardiaque. Deux causes essentielles sont à l'origine d'une arythmie : les troubles de l'automatisme et les troubles de la conduction.

1. Troubles de l'automatisme

- au niveau du nœud SA : arythmie sinusale, bradycardie ou tachycardie sinusale ;
- au niveau de foyers irritatifs ectopiques (nœud AV, oreillettes ou ventricules) prenant le rôle de *pacemaker* cardiaque, à l'origine d'extrasystoles nodales, auriculaires ou ventriculaires. Selon la fréquence des décharges, apparition de tachycardies

paroxystiques nodales, auriculaires, ventriculaires, flutter auriculaire, fibrillation auriculaire ou ventriculaire ;
- à partir d'une zone non automatique (cellules du myocarde contractile), apparition de propriétés automatiques (par exemple une surcharge calcique cellulaire faisant suite à une ischémie ou à une intoxication digitalique entraîne des post dépolarisations précoces ou tardives).

2. Troubles de la conduction

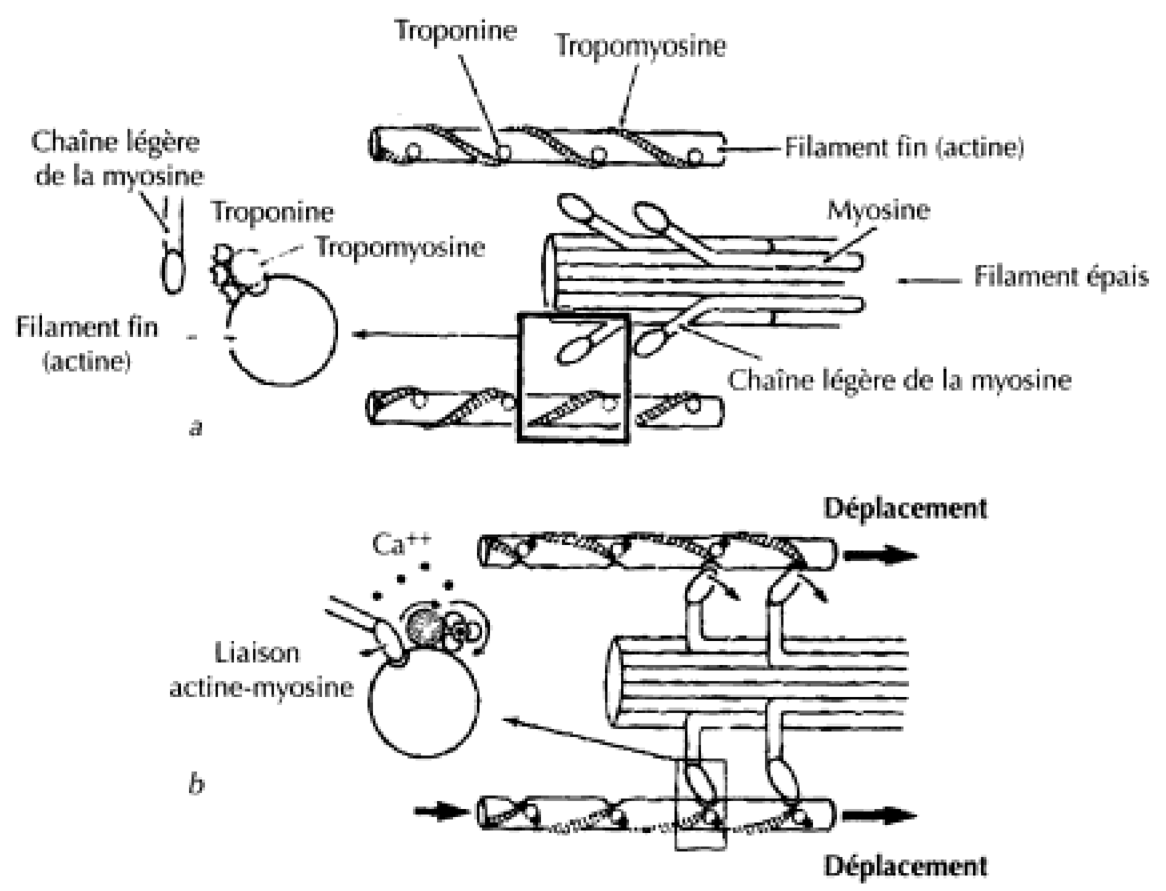
Les arythmies par trouble de conduction sont plus fréquentes que par trouble de l'automatisme. La conduction du front de l'onde venant du nœud SA peut être bloquée à n'importe quel endroit. La plupart des anomalies de conduction se produisent au niveau du nœud AV et conduisent à un bloc cardiaque de 1er (intoxication digitalique par exemple), 2e ou 3e degré (bloc complet lors d'un infarctus cardiaque par exemple) ou à des blocs de branche (branches gauche ou droite du faisceau de His).
La conduction peut être retardée, à l'origine du phénomène de ré-entrée. Ainsi, l'existence d'un bloc unidirectionnel et d'un retard de conduction dans une zone d'ischémie peut entraîner l'apparition d'une dépolarisation de type circulaire dans une zone adjacente dont la période réfractaire peut être terminée lorsque l'activité de ré-entrée arrive. Ce phénomène est responsable de tachyarythmies.
Toutes les arythmies sont potentiellement dangereuses, mais les troubles létaux sont habituellement du type ré-entrée.

C. Contraction cardiaque

Les flux ioniques spécifiques entraînant le potentiel d'action augmentent la concentration de calcium libre intracellulaire dans la cellule musculaire cardiaque. Ce calcium libre active la myosine ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction de la cellule myocardique (*fig.* 2).

D. Régulation circulatoire

La régulation circulatoire est assurée par deux paramètres importants : la pression artérielle et le débit cardiaque.
La pression artérielle est maintenue dans des limites physiologiques étroites par intervention de deux mécanismes, l'un à court terme médié par le baroréflexe qui répond de façon instantanée à toute modification de pression, l'autre à moyen et long terme médié par le rein (système rénine-angiotensine-aldostérone) de plus grande inertie, et qui répond aux variations de volémie. Le système nerveux sympathique régule le tout : une augmentation de tonus sympathique provoque une augmentation de débit cardiaque avec une augmentation des résistances artérielles périphériques, une diminution de la compliance veineuse, une stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone.
Le débit cardiaque peut varier en fonction des besoins énergétiques des divers tissus de l'organisme. Son contrôle est assuré par deux mécanismes, l'un nerveux faisant intervenir le système sympathique au niveau des muscles lisses artériolaires, l'autre local par autorégulation.



Les protéines contractiles myocardiques et la contraction :
Les filaments fins et les filaments épais pendant la relaxation (a) ;
Les filaments fins et les filaments épais pendant la contraction (b).
Source : C. Libersa et J. Caron, *Médicaments en pathologie cardiovasculaire,* Masson 1990.

Figure 2. Mécanisme de la contraction cardiaque

II. Lésions fonctionnelles d'origine toxique

A. Niveau cardiaque

Essentiellement en relation avec des modifications des propriétés électriques et/ou contractiles du cœur, à l'origine de troubles du rythme, de la conduction, de l'excitabilité ou de la contractilité cardiaque.

1. Sur le rythme

a) Troubles de l'automatisme

- ***Perturbation des gradients et des flux ioniques à l'origine de l'influx cardiaque***

Cas du *strontium* et du *baryum* qui peuvent passer par les canaux lents à la place du calcium en entraînant des arythmies, extrasystoles ventriculaires et tachycardies, à l'origine d'une fibrillation ventriculaire et d'un arrêt cardiaque. Ces effets semblent en relation avec une inhibition de la sortie des ions potassium des cellules cardiaques.

■ *Troubles de la repolarisation*

Induction de post-dépolarisations par de fortes concentrations de *calcium*, ou par suite d'une activité élevée *sympathomimétique*, ou encore lors d'une intoxication par les *glucosides cardiotoniques*.

b) Troubles de conduction

- effet pro-arythmique paradoxal des anti-arythmiques de classe I (quinidine, procaïnamide, disopyramide) agissant par blocage des canaux sodiques. Ceci entraîne des troubles de conduction des zones déjà déprimées et facilite la survenue d'un ralentissement de conduction et de nouveaux blocs unidirectionnels favorables au développement de phénomènes de ré-entrée ;
- effet des glucosides cardiotoniques : apparition de bloc AV par allongement de la période réfractaire au niveau du nœud AV, responsable d'une diminution de la vitesse de conduction.

c) Sensibilisation aux arythmies

- Effet bien connu de certains hydrocarbures aliphatiques halogénés (chloroforme) par sensibilisation aux amines pressives. Le mécanisme est dû à des perturbations de l'automaticité et de la conduction. Les hydrocarbures responsables produisent :
  - une migration du *pacemaker* au nœud AV ;
  - une facilitation de propagation des extrasystoles par une nette diminution de la période réfractaire au niveau du système de Purkinje ;
  - un ralentissement de conduction ventriculaire facilitant l'activité arythmique par le mécanisme de ré-entrée.

L'administration de catécholamines chez un sujet ayant reçu ces hydrocarbures halogénés, même à doses très faibles, entraîne l'apparition de tachycardie sinusale, tachycardie ventriculaire et finalement de fibrillation ventriculaire.

- Effet des glucosides cardiotoniques en cas d'hypokaliémie : la capacité de fixation des digitaliques sur le myocarde, et donc au niveau de la Na^+-K^+-ATPase membranaire, est influencée de façon compétitive par la concentration locale en ions potassium. Toute baisse en ions potassium entraîne une fixation accrue des digitaliques, donc un effet inhibiteur plus intense. À fortes doses, les digitaliques produiront des post-dépolarisations qui, associées aux troubles de conduction, favorisent des troubles du rythme graves et une fibrillation ventriculaire.

2. Sur la contraction

Les xénobiotiques peuvent modifier la force contractile myocardique par action à différents niveaux :

- système nerveux autonome : cardio-accélération par stimulation sympathique ; cardio-inhibition par stimulation parasympathique ;
- énergétique : perturbation de la *synthèse de l'ATP* ; modification du taux en *AMP cyclique* (*les catécholamines*, en augmentant le taux d'AMP cyclique, régulent les mouvements du calcium intracellulaire et augmentent la force contractile ; les *bêtabloquants*, en inhibant ces effets produisent un effet inotrope négatif) ;
- couplage excitation-contraction : des modifications de perméabilité membranaire ou d'activités enzymatiques liées aux membranes entraînent une toxicité

cardiaque (les antagonistes calciques type vérapamil exercent un effet inotrope négatif lié à l'inhibition du courant entrant lent calcique) ;
- systèmes régulateurs du calcium intracellulaire : toxiques agissant sur le réticulum sarcoplasmique ou les mitochondries (le plomb inhibe la phosphorylation oxydative mitochondriale et perturbe les mouvements du calcium) ;
- protéines contractiles : effet inotrope négatif de l'halothane dû en partie à l'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine.

B. Niveau vasculaire

1. Hypotension

Manifestation commune à de nombreuses intoxications aiguës.
En fonction de l'étiologie et du mode de survenue, on distingue :
- hypotension orthostatique : hypotenseurs sympatholytiques surtout α-bloquants, vasodilatateurs, neuroleptiques et antidépresseurs imipraminiques par effet α-bloquant, antidépresseurs centraux (rarement), diurétiques ;
- collapsus cardiovasculaire : lorsque la défaillance circulatoire s'accompagne d'une chute tensionnelle importante. Lié à une perte liquidienne (vomissements, diarrhées, hémorragies), ou à une vasoplégie, ou les deux phénomènes simultanément : intoxications massives par psychotropes (hypnotiques) ;
- choc cardiovasculaire : différencié du collapsus par l'existence de signes cliniques périphériques importants et de défaut d'irrigation viscérale. Mécanisme cardiaque : choc cardiogénique (tout toxique à effet inotrope négatif) ou extracardiaque : choc vasoplégique (toxique induisant un phénomène anaphylactique), choc hypovolémique (toxiques induisant des pertes digestives, une exsudation plasmatique, une hémolyse, une hémorragie).

2. Hypertension

Peut être à l'origine d'accidents cérébrovasculaires. De nombreux xénobiotiques entraînent une hypertension aiguë : surdosage en substances *sympathomimétiques* ou *parasympatholytiques*, *minéralocorticoïdes* en présence d'un excès de sodium, *glycyrrhizine* de la réglisse par son effet aldostérone-like, toxiques provoquant une hyper-réninémie comme le *cadmium* par augmentation de l'angiotensine II, hypertension associée aux néphropathies induites par les *analgésiques* par déplétion en prostaglandines vasodilatatrices médullaires rénales.

3. Hémorragie

Altération commune à de nombreuses intoxications aiguës :
- mécanisme surtout par atteinte des territoires capillaires : mécanismes non spécifiques (anoxie, lésions corrosives), ou spécifiques (action toxique sur les facteurs de coagulation : anticoagulants héparines, AVK, fibrinolytiques) ;
- mécanisme par atteinte au niveau plaquettaire : mécanisme direct (thrombocytopénie induite par les anticancéreux) ou mécanisme immunologique (pyrazolés).

4. Thrombose – embolie

Formation de caillots artériels ou veineux d'origine toxique par des mécanismes très divers : induction d'une agrégation plaquettaire, action au niveau de l'antithrombine III (*contraceptifs oraux*), inhibition de la fibrinolyse (*corticostéroïdes, mercuriels*), thrombose artérielle par vasoconstriction (*ergotamine*) ou par diminution de résistance périphérique, thrombose veineuse par stase veineuse, lésions vasculaires par administration intraveineuse de toxiques *irritants*. Les thrombi peuvent provoquer une embolie (thromboembolisme des stéroïdes *contraceptifs*).

III. Lésions morphologiques d'origine toxique

A. Niveau cardiaque

Lésions dégénératives, focales ou diffuses, entraînant par perte de tissu myocardique une fonction cardiaque anormale.
On peut distinguer :

- hypertrophie : augmentation, en général compensatrice, de la masse musculaire cardiaque au-delà de la normale. Intéresse habituellement une seule partie du cœur : partie droite lors d'une insuffisance pulmonaire, partie gauche si hypertension sévère persistante. En relation avec une augmentation des éléments contractiles et des mitochondries. En général, résultat d'anomalies congénitales, d'un fonctionnement anormal des valvules aortiques ou d'une hypertension systémique, mais aussi à la suite de l'utilisation prolongée de substances telles que les hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance, les catécholamines. Entraîne à la longue un épuisement cellulaire avec des modifications dégénératives à l'origine d'une insuffisance cardiaque ;
- myocardiopathies : dans la forme congestive, responsabilité de l'alcoolisme, des antinéoplasiques (anthracyclines) utilisés au long cours ; dans la forme obstructive, association avec une nécrose myocardique induite par le méthysergide, le tartrate d'ergotamine, l'allylamine ;
- nécrose myocardique pouvant atteindre l'ensemble du myocarde (contrairement à l'infarctus classique qui concerne essentiellement l'endocarde). Responsabilité des amines sympathomimétiques à forte concentration, en particulier l'isoprénaline ;
- myocardites : réactions inflammatoires directes (dose-dépendantes) ou surtout par réaction d'hypersensibilité. Par exemple, myocardite après traitement par la pénicilline, les sulfonamides, la méthyldopa ; fibrose de l'endocarde ou fibrose valvulaire auto-immune chez les sujets traités par le méthysergide ; réaction de type LED après traitement à long terme par l'hydralazine, le procaïnamide.

B. Niveau vasculaire

Lésions dégénératives et inflammatoires faisant suite :

- soit à un effet pharmacologique intense. Ainsi, l'ergotamine conduit à une gangrène par vasoconstriction prolongée ;

- soit à une interaction du toxique avec une macromolécule vasculaire structurale ou fonctionnelle. Par exemple, l'allylamine simule le développement de l'athérosclérose par action de son métabolite, l'acroléine, responsable d'une hyperplasie de la musculature lisse vasculaire, avec dépôts fibrineux conduisant à une nécrose fibrinoïde au niveau des coronaires et de l'aorte.

L'athérosclérose est une modification dégénérative complexe qui affecte principalement les gros vaisseaux sanguins et les artères coronaires. L'étiologie en est complexe, mais certains toxiques peuvent aggraver la pathologie. *L'oxyde de carbone* et le *sulfure de carbone* lèsent l'endothélium, augmentent la perméabilité des capillaires entourant ces artères et sont à l'origine de changements dégénératifs.
Les modifications vasculaires toxiques peuvent être dues également à un phénomène d'hypersensibilité de nature immunologique (dépôt de complexes immuns solubles dans la paroi vasculaire, avec activation par le complément) : vascularite touchant les petits vaisseaux et les coronaires, avec infiltration mononucléaire et éosinophile, par les *sels d'or*, la *méthyldopa*, la *pénicilline*, les *sulfonamides*.

IV. Mécanismes d'action des principales classes de substances cardiotoxiques

Les substances cardiotoxiques peuvent agir selon trois principaux mécanismes :
- pharmacologique ;
- interaction non spécifique avec un composant endogène ;
- immunologique.

Nous nous limiterons à l'étude des seules substances agissant essentiellement au niveau cardiaque.

A. Mécanisme pharmacologique

1. Intoxications par surdosage en médicaments à activité pharmacologique cardiovasculaire

a) Glucosides cardiotoniques

Agissant par blocage de la pompe Na^+-K^+-ATPase, ils provoquent une augmentation du Na^+ intracellulaire, d'où élévation du Ca^{++} intracellulaire par inversion des échanges Na^+/Ca^{++}. Lors d'une intoxication, apparaissent des troubles de l'excitabilité (tachycardie auriculaire et jonctionnelle, extrasystoles ventriculaires, tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire) et de la conduction (ralentissement de la conduction au niveau jonctionnel, à l'origine de blocs auriculo-ventriculaires, allant jusqu'à l'arrêt cardiaque). Sensibilisation aux digitaliques lors d'une hypercalcémie (attention au calcium par voie intraveineuse) ou d'une hypokaliémie (induite par exemple par un traitement diurétique).

b) Antiarythmiques

Ils sont répartis en quatre classes selon la classification de Vaughan-Williams.

■ *Classe I*

Action par dépression du canal sodique rapide (effet stabilisant de membrane) (*quinidiniques, disopyramide, lidocaïne, méxilétine, cibenzoline, propafénone, flécaïnide, aprindine, nadoxolol*). Le surdosage entraîne des troubles de conduction à tous les niveaux (sinusal, bloc auriculo-ventriculaire, bloc intraventriculaire) et des troubles du rythme (effet pro-arythmogène paradoxal) par un mécanisme de ré-entrée, conduisant à un arrêt cardiaque.

■ *Classe II : Bêtabloquants (chef de file : propranolol)*

Action par inhibition des récepteurs β-adrénergiques. Leur surdosage produit une bradycardie excessive avec chute tensionnelle et peut être responsable d'un bloc auriculo-ventriculaire. Ils peuvent entraîner une défaillance cardiaque.
De plus, il y a danger d'effet « rebond » après arrêt brutal, dû à l'augmentation adaptative du nombre de récepteurs β-adrénergiques. Cet effet se caractérise alors par une tachycardie, une hypertension, une augmentation du travail cardiaque et de la consommation en oxygène, à l'origine d'une insuffisance coronaire ou même d'un infarctus du myocarde.

■ *Classe III : amiodarone*

Action par allongement de la durée du potentiel d'action et de la durée des périodes réfractaires cardiaques. Action toxique de type bradycardie excessive et troubles de conduction AV.

■ *Classe IV : inhibiteurs calciques*

Action par inhibition du courant calcique lent entrant dans le myocyte. En cas d'intoxication, les effets sont variables selon le profil pharmacologique du produit (antagonistes sélectifs ou non) :
- inhibiteurs cardio-sélectifs : troubles sévères de la conduction et de l'automatisme, avec possibilité de décompensation cardiaque par leur caractère fortement inotrope négatif. Le vérapamil est responsable de bradycardie, de BAV et d'hypotension. Le diltiazem est responsable de bradycardies sinusales et de blocs sino-auriculaires ;
- inhibiteurs vaso-sélectifs (dihydropyridines) : hypotension pouvant entraîner un choc cardiogénique, tachycardie par réflexe sympathique.

c) Antihypertenseurs

■ *Vasodilatateurs (hydralazines)*

Par leur action directe sur la fibre musculaire lisse, ils peuvent entraîner une hypotension et une tachycardie par réaction sympathique réflexe.

■ *Antihypertenseurs centraux (clonidine, méthyldopa)*

Diminution du tonus sympathique par action sur le SNC. Responsables de bradycardies sévères à dose toxique, en particulier la clonidine.

d) Stimulants adrénergiques

■ ***Les stimulants adrénergiques directs***

- de type α (phényléphrine), $\alpha + \beta$ (catécholamines), $\beta 1$(dobutamine) sont responsables de troubles du rythme importants (arythmies ventriculaires, tachycardies) avec poussées tensionnelles. Le risque d'infarctus du myocarde est élevé chez les sujets coronariens, en raison de l'augmentation du travail cardiaque (inotropisme positif et augmentation de fréquence) et donc de l'augmentation de consommation d'oxygène, qui entraîne une hypoxie, sensible surtout au niveau ventriculaire gauche ;
- de type $\beta 1 + \beta 2$ (isoprénaline) donnent naissance à des troubles du rythme (tachycardie, arythmie ventriculaire) et à une chute de pression artérielle, celle-ci étant due à l'effet $\beta 2$ prédominant.

■ ***Les stimulants adrénergiques indirects***

Éphédrine, amphétamines, cocaïne (mais également la tyramine contenue dans certains aliments) donnent des effets semblables à l'adrénaline qu'ils libèrent. La cocaïne en particulier est responsable de la survenue d'infarctus, surtout lorsque préexiste angor, hypertension ou athérosclérose coronaire.

2. Médicaments à activité pharmacologique principale autre que cardiovasculaire

a) Psychotropes

- les *antidépresseurs tricycliques (imipramine, amitriptyline...)*, par leurs propriétés quinidine-like entraînent des troubles de conduction, des blocs de branche et des arythmies ventriculaires et supraventriculaires, des arrêts cardiaques. Ils sont responsables d'hypotension par action inhibitrice du recaptage noradrénergique et par effet α-bloquant ;
- les IMAO produisent des crises hypertensives s'ils sont associés aux antidépresseurs tricycliques, aux sympathomimétiques ou à des aliments contenant de la tyramine ;
- les *neuroleptiques* tels que *l'halopéridol* ou la *chlorpromazine*, par leurs effets α-bloquants peuvent provoquer une hypotension orthostatique et des tachyarythmies ;
- le lithium peut produire des arythmies ventriculaires.

b) Anesthésiques généraux halogénés

Ils sont connus pour leurs propriétés cardio-dépressives (inotrope, chronotrope, dromotrope négatives), en relation avec le nombre de substituants halogénés et l'insaturation de la molécule. Ces effets seraient dus à des perturbations de production et d'utilisation de l'énergie et à des troubles de transfert intracellulaire du calcium. Certains sensibilisent à l'effet arythmogène de l'adrénaline endogène ou des agonistes β-adrénergiques : « syncope adrénalino-chloroformique » avec le *chloroforme*. Les hydrocarbures halogénés utilisés comme anesthésiques par inhalation (*halothane, enflurane*) possèdent ces propriétés et peuvent provoquer une dépression myocardique, voire un arrêt cardiaque.

c) Anesthésiques locaux

Ceux à fonction amide (*lidocaïne*), utilisés à hautes doses, ou par passage intraveineux accidentel, provoquent une fibrillation ventriculaire et un arrêt cardiaque (voir anti-arythmiques).

d) Antibiotiques antibactériens et antifongiques

Les *amino-glycosides* (*streptomycine, gentamycine, kanamycine, amikacine*...) ont une action cardio-dépressive. La *gentamycine*, par exemple, agit par inhibition de capture ou de liaison du calcium au niveau du sarcolemme, entraînant un blocage des canaux calciques, responsable de l'effet inotrope négatif. Parmi les macrolides, l'*érythromycine* est responsable de tachyarythmies de type torsades de pointe. Les *tétracyclines* et le *chloramphénicol* diminuent la contractilité cardiaque par un effet direct sur le myocarde et indirectement par diminution de la concentration en calcium. *L'amphotéricine B* diminue la contractilité par blocage des canaux calciques lents et inhibition de l'entrée du sodium.

B. Mécanisme par interaction non spécifique avec un composant endogène

Ici, le mécanisme de la toxicité ne peut s'expliquer par une liaison spécifique ligand-récepteur comme dans les cas précédents, mais par des interactions non spécifiques irréversibles entre le toxique (ou un métabolite) et une molécule ou un ion indispensable au plan fonctionnel ou structural.

1. Allylamine

Son métabolite, *l'acroléine*, réagit de façon covalente avec les structures protéiques et nucléiques cardiaques. Il est responsable de l'apparition en quelques semaines de fibroses au niveau vasculaire et myocardique. La liaison de l'acroléine au glutathion réduit tissulaire constitue un mécanisme protecteur par formation de dérivé mercapturique.

2. Anthracyclines

Ces agents anticancéreux de type intercalant (*doxorubicine, daunorubicine*) agissent par transformation en radicaux libres semi-quinoniques, responsables de la formation de radical anion superoxyde et autres radicaux oxygène, initiateurs d'une lipoperoxydation tissulaire au niveau cardiaque, tissu plus sensible à ce mécanisme en raison de sa relative pauvreté en systèmes anti-radicalaires. Le processus explique le développement dose cumulatif d'une myocardiopathie (dilatation cardiaque, atrophie, dégénérescence myocytaire, œdème interstitiel et fibrose).

3. Métaux lourds

En administration répétée, le *cadmium* surtout, le *plomb*, le *cobalt*, présentent des effets cardiotoxiques : inotropisme et dromotropisme négatifs, avec altérations structurales. Ces effets toxiques sont attribués en partie à une action antagoniste

vis-à-vis du calcium et à leur aptitude à former des complexes avec des macromolécules intracellulaires (action thioloprive des métaux lourds sur l'actine et la myosine). Le *cobalt* a été mis en cause dans une myocardiopathie endémique chez des buveurs excessifs de bière au Canada, où cet élément était utilisé comme additif de stabilisation de la mousse ; le cobalt intervient probablement par inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial. D'autres cations antagonistes du calcium sont également générateurs de myocardiopathies : nickel, baryum, manganèse.

4. Alcool éthylique

En *intoxication aiguë*, il exerce un effet cardiodépresseur (inotropisme et dromotropisme négatifs) lié à une inhibition du transport intracellulaire du calcium. En *intoxication chronique*, en revanche, les arythmies prédominent (fibrillation ventriculaire et arrêt cardiaque) avec développement d'altérations myocardiques caractéristiques (myocardiopathie avec cardiomégalie, fibrose interstitielle, infiltration lipidique des myocytes). Ces altérations structurales sont liées aux dérèglements métaboliques accompagnant l'alcoolisme.
Le *méthanol* et les *alcools supérieurs* exercent des effets cardiotoxiques semblables.

C. Mécanisme immunologique

La molécule toxique peut se comporter comme un haptène capable de réagir avec les macromolécules endogènes pour devenir antigénique, mais elle peut être également directement antigénique, capable de réagir avec les cellules immunocompétentes.
Des réactions d'hypersensibilité à médiation humorale (type I, II ou III de Gell et Coombs) sont possibles. Des médicaments tels que les *pénicillines*, *l'aspirine* et les *sulfonamides* peuvent donner lieu à de telles réactions. Cependant leur incidence est relativement faible et implique certainement l'intervention d'autres facteurs, en particulier génétiques.

L'essentiel de la question

De nombreux xénobiotiques peuvent présenter des effets néfastes sur la fonction et/ou sur les structures cardiaques. La conduction des signaux électriques et le métabolisme cellulaire constituent des cibles privilégiées en raison de leur rôle prépondérant dans le fonctionnement de l'organe. Le mécanisme probablement le plus vulnérable est l'utilisation de l'énergie et les mouvements intracellulaires du calcium.
Les substances cardiotoxiques peuvent être distinguées en substances agissant essentiellement sur la fonction cardiaque, et celles dont les effets s'exercent principalement sur la structure de l'organe. Néanmoins, cette distinction ne doit pas être tenue pour stricte, sachant qu'une lésion morphologique peut avoir des conséquences sur la conduction et donc sur la fonction cardiaque. Inversement, un trouble fonctionnel persistant peut entraîner des lésions morphologiques.
Les lésions fonctionnelles les plus caractéristiques sont constituées par les arythmies et la diminution de la force contractile myocardique. Parmi les médicaments utilisés en cardiologie, les glucosides cardiotoniques, les antiarythmiques et les stimulants

adrénergiques constituent, lorsqu'ils sont administrés à dose toxique, des cardiotoxiques responsables d'arythmies et/ou de troubles de l'inotropisme. Il en est de même pour d'autres classes thérapeutiques, en particulier les psychotropes, les anesthésiques ou les antibiotiques dont certains sont responsables de cardio-dépression.
Les lésions morphologiques d'origine toxique sont des lésions dégénératives, locales ou diffuses, entraînant par perte de tissu myocardique une déficience fonctionnelle. On distingue l'hypertrophie, processus surtout adaptatif, les myocardiopathies, la nécrose myocardique et les myocardites où interviennent des processus inflammatoires ou des réactions d'hypersensibilité.
Concernant les effets des xénobiotiques au niveau vasculaire, les lésions fonctionnelles principales, à savoir hypotension, hypertension, hémorragie, thrombose-embolie sont des manifestations communes à de nombreuses intoxications aiguës et concernent donc des substances très variées. Quant aux lésions morphologiques vasculaires, il s'agit de lésions dégénératives et inflammatoires de mécanisme souvent complexe, où peuvent intervenir des effets pharmacologiques, biochimiques ou même immunologiques.

Pour en savoir plus

- Libersa C., Caron J. *Médicaments en… Pathologie cardiovasculaire*. Collection sous la direction de P. Netter. Masson éd 1990.
- Katzung BG. *Basic & clinical Pharmacology*. Appleton & Lange 1995.
- Verheyen A. *Cardiovascular toxicology : toxicological pathology and methodological aspects*. Study Unit 26. pages 789-815, in RJM Niesink, J de Vries, MA Hollinger. Toxicology. Principles and applications. CRC Press 1996.
- Ramos KS, Chacon E, Acosta D. *Toxic responses of the heart and vascular systems*. Chap ter 17. pages 487-527, in CD Klaassen. Casarett & Doull's. Toxicology. The basic science of poisons. 5th edition. Mc Graw Hill 1996.

Toxicologie des radioéléments

J.-Y. LE TALAER, V. ANDRÉ
Groupe régional d'études sur le cancer (GRECAN), département de biochimie-toxicologie, UFR des sciences pharmaceutiques, Caen.

Le domaine de la radiotoxicologie a pris une importance de plus en plus grande après la Seconde Guerre mondiale. Les risques n'ont d'abord concerné que le domaine médical et scientifique. Devant le développement de l'industrie électronucléaire et l'utilisation à des fins militaires d'armes nucléaires, le danger pour les personnes s'est accru. Les moyens mis en œuvre pour comprendre les effets des rayonnements se sont considérablement renforcés et ont conduit à définir des normes de protection très précises.
Cette question nécessite quelques rappels de physique concernant les rayonnements ionisants et les radio-isotopes. Certains éléments peuvent être empruntés à la question sur les rayonnements (voir partie « Biophysique, chimie organique et chimie analytique » dans ce tome).

I. Rappels de physique

Le rayonnement est de l'énergie en mouvement qui se propage dans l'air sous la forme d'une onde ou d'un flux de particules. Il est dit ionisant si son énergie est suffisamment élevée pour qu'il soit capable de provoquer l'ionisation d'une molécule d'air. Pour ioniser une molécule d'eau ou d'air, une particule doit avoir une énergie supérieure à 14 eV. L'énergie des rayons X variant entre 1 000 eV et quelques dizaines de millions d'électronvolts, ils sont donc ionisants.

A. Types de rayonnements ionisants

- Non chargés : électromagnétiques (rayons X ou gamma), ou neutrons.
- Particules chargées : alpha (α), bêta⁻ (β^-) et bêta⁺ (β^+).

1. Particules α

Ce sont des noyaux d'hélium de masse égale à 7 000 fois celle de l'électron, des particules lourdes d'énergie comprise entre 1,8 MeV et 8,7 MeV (^{212}Po) et plus généralement entre 4 et 8 MeV.
Parcours : rectiligne ; du fait de leur masse ils ne sont pas déviés. Un parcours dans l'air, fonction de leur énergie, peut être de l'ordre de quelques centimètres et de quelques microns dans les tissus.

Tableau 1. Distance parcourue par une particule α en fonction de son énergie

Énergie des α (MeV)	Dans l'air (cm)	Tissus (µm)
4	2,4	24
6	4,6	45
8	7,2	70

Excitation, ionisation : les α, particules lourdes, cèdent leur énergie par petites fractions au cours d'un grand nombre de chocs avec les électrons, particules légères des atomes qui se trouvent ainsi excités ou ionisés.
L'ionisation spécifique varie le long de la trajectoire sur laquelle la particule dissipe son énergie. La courbe de Bragg donne la densité d'ionisation le long de la trajectoire d'une particule α.
Étant donné leur très grande énergie (plusieurs millions d'électronvolts) et leur faible parcours, les α sont très ionisants. Par exemple, un α de 5 MeV dans l'air produira près de 15.10^4 paires d'ions.

2. Particules β

Les β sont des électrons qui ne sont pas monoénergétiques mais distribués selon un spectre d'énergie caractéristique du radio-isotope.
Pour simplifier certains problèmes de radioprotection, on s'intéresse le plus souvent à l'énergie moyenne des β ; elle correspond sensiblement au tiers de l'énergie maximale.
Les énergies des émetteurs β sont comprises entre 18 KeV (^3H) et 13 MeV (^8Li). Plus généralement, le domaine d'énergie se situe environ entre 18 KeV et 3 MeV.
Parcours : les électrons, particules légères (environ 1/7 000 de la masse de la particule α) au cours de leur déplacement dans la matière, subissent un grand nombre de collisions avec faibles pertes d'énergie, et ont un parcours très sinueux par suite de la diffusion coulombienne. Ceci entraîne un pouvoir élevé de rétrodiffusion de ces particules. L'étude du parcours des β dans la matière est également compliquée du fait qu'ils présentent un spectre continu d'émission, caractéristique de chaque radioélément.
Parcours : dans l'air, de quelques millimètres à quelques dizaines de mètres.
Exemple : pour le ^3H (E_{max} = 18 KeV), 5 mm dans l'air.

Tableau 2. Parcours des particules β dans l'air

E_{max} (MeV)	0,1	1	2
P_{max} (mètres)	0,10	3	6,6

Dans la matière, le parcours varie à peu près en raison inverse de la densité. Ainsi les β du tritium ont un parcours maximum de 6 µm dans l'eau et de 2 µm dans l'aluminium. Les particules β engendrent des phénomènes d'excitation et d'ionisation. Une masse plus faible et leur charge plus petite les rendent beaucoup moins ionisants que les α.
Rayonnement de freinage : par effet coulombien, lorsqu'un électron passe au voisinage d'un atome, il subit un changement de direction et un freinage. Il perd une partie de son énergie qui est émise sous forme de photons, qui constituent le rayonnement de freinage. Ce phénomène prend de l'importance avec des β énergétiques et quand le matériau ralentisseur est de Z élevé.

Les particules β^+ (positons) ne se distinguent des négatons que par le signe de leur charge électrique. Quand leur énergie est tombée à une valeur très faible (< 1 eV), ils s'annihilent en rencontrant un électron. Dans ce processus, les deux charges s'annulent et les deux masses disparaissent en créant deux rayonnements γ émis à 180° dans des directions opposées.

3. Photons X et γ

Rayonnements électromagnétiques comme les UV et la lumière, les photons X résultent soit du ralentissement des électrons dans la matière (rayonnement de freinage ou *bremsstrahlung*), soit du changement de niveaux d'énergie des électrons de l'atome (photons de fluorescence). La différence essentielle entre les X et les γ réside dans leur mode de production. Les premiers prennent naissance au niveau du cortège électronique (rayonnement de freinage ou de fluorescence), alors que les seconds sont issus du noyau de l'atome (désexcitation).

B. Notion de dose. Unités

On mesure l'effet d'une irradiation par l'énergie communiquée par le rayonnement étudié à une unité de masse de matière placée dans le champ. Cette grandeur est appelée « dose absorbée » et est exprimée en grays (unité SI) ; on la trouve encore quelquefois exprimée en rads (*radiation absorbed dose*) :
- 1 gray (Gy) = 1 joule/kg ;
- 1 gray = 100 rads.

Cependant, les effets biologiques varient selon divers facteurs, d'où l'utilisation d'une autre grandeur, le sievert (Sv, unité SI), ou encore le rem (*radiation équivalent man*) ; c'est un « équivalent de dose », utilisé en radioprotection. La définition tient compte de l'effet biologique des rayonnements ionisants et donc de l'importance du risque (*tab. 3*).
Le facteur de qualité (Q) exprime le fait que les effets biologiques sont différents selon la nature du rayonnement (*tab. 3*).
Les particules α sont beaucoup plus nocives au contact de la cible biologique (Q est égal à 20 pour les rayons α), par rapport aux rayons X pris comme référence et pour lesquels Q = 1.
L'équivalent de dose a donc été défini pour permettre d'additionner ou de comparer entre eux les effets des divers rayonnements ionisants.

Tableau 3. Définitions

H (Sv ou rem) = D (Gy ou rad) × Q	
H = équivalent de dose	
D = dose absorbée	
Q = facteur de qualité, variable selon la nature du rayonnement :	
– rayonnement X, α, β^- β^+	1
– neutrons et protons	10
– particules α	20

Autres unités :
- le curie est l'unité d'activité définie comme la quantité d'un corps radioactif dans lequel le nombre de désintégrations par seconde est de $3,7.10^{10}$;
- le becquerel (unité SI, Bq) est égal à 1 désintégration par seconde, 1 curie = $3,7.10^{10}$ Bq.

Pour une même activité, la masse d'un corps radioactif est d'autant plus faible que sa période est plus courte.

II. Modes d'exposition aux rayonnements ionisants

On peut s'exposer à deux types de risques.

A. Irradiation externe

On se trouve sur le trajet du rayonnement émis par des substances radioactives situées à l'extérieur de l'organisme.
Les rayons X et γ sont en cause car leur parcours est important et ils peuvent pénétrer profondément dans le corps humain. Dans certaines situations, les bêta peuvent présenter un risque d'irradiation externe, le risque étant plus grand si le radioélément émetteur est déposé sur la peau, ou si l'énergie du rayonnement est supérieure à 65 KeV. Les particules bêta peuvent être indirectement responsables d'une exposition externe. Lorsqu'elles ralentissent au contact de certains métaux, elles produisent des rayons X appelés rayonnement de freinage. Ne pas oublier que les rayonnements émis peuvent atteindre la personne directement ou après diffusion sur les parois.
Si tout l'organisme est atteint, il y a irradiation globale, si une partie seulement est atteinte, il y a irradiation partielle.
Il n'y a pas de risque d'irradiation externe avec les rayonnements α.
En cas de contact cutané, le risque majeur est le passage du radioélément au travers d'une plaie, ou plus rarement au travers d'une peau saine, conduisant à une situation d'exposition interne (ou contamination).

B. Irradiation interne (ou contamination)

Elle est réalisée lorsqu'un radio-isotope pénètre dans l'organisme par voie digestive, respiratoire, ou est absorbé par la peau ou les muqueuses, ou au niveau de lésions de celle-ci.
Le risque dû à ces expositions peut également varier selon certains paramètres – l'importance de la dose absorbée, le débit, la durée de l'irradiation –, qui peuvent entraîner des effets de type aigu (explosion nucléaire, par exemple) ou chronique, s'étalant dans le temps (retombées de poussières radioactives). Les rayonnements α sont les plus dangereux au contact des cibles biologiques car ils sont fortement ionisants.
L'exposition de l'organisme se poursuit tant que le radioélément n'a pas été éliminé (les notions de période biologique et de doses engagées sont développées plus loin).

III. Mécanisme d'action. Effets biologiques

A. Interactions avec la matière. Phénomènes atomiques élémentaires

Par suite de l'interaction du rayonnement avec la matière, les phénomènes physiques qui interviennent sont l'excitation et l'ionisation des atomes ou molécules.

1. Excitation

Un ou plusieurs électrons périphériques d'un atome libre ou d'un édifice moléculaire sont portés sur des orbites plus éloignées que la normale. Cet état est instable : quand l'électron revient sur une orbite plus centrale, cette énergie est libérée sous forme de photons de fluorescence.
Les énergies d'excitation sont en moyenne de quelques électronvolts (il faut 4 eV pour rompre une liaison CH).

2. Ionisation

Si l'énergie reçue par l'électron est suffisamment grande, la liaison atome-électron se rompt, l'atome qui a perdu un électron est ionisé et est devenu un ion positif. Si l'énergie communiquée est supérieure à l'énergie de liaison, l'électron émis peut à son tour provoquer d'autres ionisations ou excitations.
L'efficacité biologique relative (EBR) d'une irradiation est proportionnelle au transfert linéaire d'énergie (TLE ou TEL), qui exprime la quantité d'énergie transférée par unité de longueur.

B. Phénomènes radiochimiques

Dans une seconde phase, également très brève, ces ionisations initiales aboutissent à endommager des macromolécules indispensables à la vie cellulaire.
On observe un effet direct lorsque les molécules lésées sont le siège d'une ionisation, ou indirect lorsqu'il est provoqué par les radicaux libres formés.

1. Effets directs sur l'ADN

Les phénomènes d'excitation et d'ionisation peuvent altérer directement les bases de l'ADN et notamment les guanines, formant ainsi des cations radicalaires.

2. Radiolyse de l'eau (effets indirects)

Elle est accompagnée de la formation d'ions radicaux extrêmement instables donnant naissance à des radicaux neutres qui sont très réactifs.

Exemple : $H_2O\ H_2O^{+\bullet} + e^-$
$H_2O^{+\bullet}\ H^+ + OH^\bullet$
$H_2O\ OH^\bullet + H^\bullet$

Cette décomposition radicalaire de l'eau est le point de départ d'altérations de nombreuses molécules ($OH^{\bullet}$ est très réactif et est un agent puissant d'oxydation). Ces effets indirects entraînent en particulier des ruptures de liaisons.

C. Effets cellulaires

1. Lésions moléculaires

Toutes les molécules biologiques peuvent être altérées, mais les conséquences qui en découlent varient selon l'importance de ces molécules. La lésion de la molécule d'ADN constitue le mécanisme essentiel d'action des rayonnements ionisants.
Les lésions produites sont :
- des ruptures de chaînes, simples ou doubles ;
- des dégradations des bases puriques et pyrimidiques ;
- des pontages (« cross links »), intrachaîne ou interchaîne, entre molécules d'ADN et protéines ;
- la formation de dimères, en particulier de dimères de thymine ;
- la création de sites abasiques ;
- l'addition sur les bases des produits issus de la peroxydation des lipides (aldéhydes notamment).

Certaines de ces lésions peuvent être réparées par les mécanismes de réparation cellulaires, en particulier les coupures monobrins et les dimères de thymine par excision-resynthèse, par transalkylation, les sites alkylés étant désalkylés par une alkyltransférase, par photorestauration qui rompt la liaison des dimères de pyrimidine grâce à une photolyase, par réparation post-réplicative par recombinaison, ou enfin par réparation SOS. En revanche, si certaines de ces lésions persistent, elles seront susceptibles d'entraîner l'apparition de mutations irréversibles et transmissibles.

2. Effets sur les chromosomes

Ces altérations entraînent des altérations chromosomiques : anomalies soit du nombre, soit de la structure (effets clastogènes) visibles au microscope, ainsi que des mutations géniques non visibles directement. On peut observer notamment : des délétions terminales, des échanges intrachromosomiques, et interchromosomiques. Des numérations d'anomalies chromosomiques peuvent être effectuées, en particulier sur les lymphocytes du sang périphérique, et être utilisées comme dosimétrie biologique dans certains cas.

IV. Effets sur l'homme. Radiopathologie

Les rayonnements ionisants n'ont aucune spécificité. Tous les organes peuvent être atteints, mais leur radiosensibilité est variable. On peut distinguer des :
- effets précoces ;
- effets somatiques tardifs, se manifestant après plusieurs années ou plusieurs dizaines d'années. Les principaux sont les cancers ;

- effets génétiques, concernant la descendance des sujets irradiés ;
- effets tératogènes par atteinte de l'embryon ou du fœtus.

A. Irradiation externe

1. Effets tissulaires précoces

Ils n'apparaissent que si la dose dépasse un certain niveau.
En cas d'irradiation globale, la gravité est fonction de la dose et de l'atteinte de certains tissus critiques (moelle osseuse, intestin), la dose létale 50 est voisine de 4 Gy pour l'homme.
Les effets constatés sont les suivants.

a) À partir de 0,15 Gy

Une stérilité masculine temporaire.

b) De 0,2 à 1 Gy

Une lymphopénie temporaire régressant spontanément, les signes fonctionnels sont nuls.
Seule se justifie une surveillance hématologique. Pas de gravité immédiate.

c) De 1 à 2 Gy

Début des manifestations fonctionnelles sans signes physiques, leucopénie et thrombocytopénie, avec quelquefois des signes fonctionnels modestes, type nausées et vomissements. Des effets immunosuppresseurs sont également envisageables. Tous ces signes sont encore réversibles.

d) De 2 à 5 Gy

La symptomatologie clinique est riche, et les perturbations biologiques précoces et importantes ; l'évolution se fait en quatre phases :
- *phase initiale* : nausées, vomissements, parfois hyperthermie, chute rapide des lymphocytes. Signes physiques inexistants ;
- *phase de latence* : durée inversement proportionnelle à la dose (2 à 3 semaines pour 3,5 à 4 Gy) ;
- *phase critique* : avec asthénie, hyperthermie, céphalées, ulcérations buccales, leucopénie et thrombocytopénie importante. L'irradié doit être traité ;
- *phase de rémission* avec récupération lente.

e) Au-delà de 6 Gy

Apparaissent en plus de rapides troubles intestinaux (diarrhées hémorragiques). La période de latence est courte.

f) À 8 Gy

Atteinte pulmonaire.

g) Au-delà de 10 Gy

Il existe des troubles neurologiques immédiats et aucune thérapeutique n'est efficace. Dans certains cas particuliers, des greffes de moelle osseuse peuvent être tentées.

2. En cas d'irradiations partielles

Il faut considérer la radiosensibilité particulière de certains organes.

a) Testicules

Oligospermie pour des doses de 0,2 Gy. Stérilité de quelques mois à deux ans pour 2 Gy. Stérilité définitive pour des doses de 3,5 à 6 Gy. Pas d'atteinte de la fonction endocrinienne.

b) Ovaires

Moins sensible que le testicule. Risques de stérilité à partir de 2,5 Gy.

c) Peau

Érythème de 3 à 8 Gy, il faut des doses de 10 Gy pour entraîner des séquelles.

d) Moelle osseuse

C'est le tissu le plus sensible à l'irradiation, c'est l'organe critique au cours d'une irradiation globale. La lymphopénie s'installe d'autant plus vite que la dose est plus forte. Cette mesure est une véritable dosimétrie biologique.

e) Autres organes

Parmi les organes à sensibilité élevée, on peut classer par radiosensibilité décroissante : les cellules sanguiformatrices, les seins, la thyroïde (surtout chez la femme), les poumons, l'intestin grêle.
La dose à ne pas dépasser sur plusieurs semaines serait de 30 Gy pour le grêle. Les poumons et le rein ne supportent pas des doses supérieures à 25-30 Gy sans altération irréversible. De même, au niveau de la moelle épinière et du cerveau, pour des doses supérieures à 40 Gy en quelques semaines. Ces risques sont surtout à considérer au cours des radiothérapies.

3. Effets tardifs

a) Cataracte radio-induite

Les risques de développer une cataracte apparaissent à partir d'une dose de 5 Gy. Cette pathologie s'installe entre un et dix ans après l'irradiation. Les premières observations de cataractes dues à des irradiations professionnelles concernent des sujets travaillant auprès de cyclotrons, exposés à une irradiation neutronique.

b) Effet sur la longévité

Un bilan récent de surveillance des survivants d'Hiroshima montre un excès de mortalité suite à des affections cardiaques, vasculaires, cérébrales ou pulmonaires pour des doses reçues au-delà de 0,5 à 1 Gy.

c) Troubles de la croissance

Ils résultent d'irradiations *in utero* à une dose supérieure à 1 Gy.

d) Réactions immunitaires

Ce n'est que si la dose pour l'ensemble des tissus lymphoïdes dépasse 1 Gy en irradiation unique que le dommage est sensible et entraîne une sensibilité aux infections.

e) Effets carcinogènes

L'étude des survivants d'Hiroshima, des données expérimentales, des études épidémiologiques (malades traités par radiothérapie, radiodiagnostic, sujets exposés professionnellement) montrent que de nombreux facteurs interviennent, liés aux caractéristiques de l'irradiation et à celles des personnes exposées :
- la dose ;
- la nature du rayonnement ;
- le débit de dose ;
- la partie du corps irradiée ;
- le sexe ;
- l'âge.

En résumé, on peut dire que la fréquence des cancers ajoutés est faible et on évalue le risque à environ 1,25 % par Gy délivré à l'ensemble de l'organisme. Les délais d'apparition sont variables, de 5 à 10 ans pour la leucémie à 40 ans pour certaines tumeurs solides.
Les tissus ont des radiosensibilités très variables, les plus sensibles étant la moelle osseuse, la thyroïde, le sein chez la femme entre 10 et 40 ans, puis l'intestin grêle.
Il est difficile de définir une dose seuil. Actuellement, le CIPR considère que le risque de mort par cancer est égal à 125 pour 100 000 personnes ayant reçu chacune 1 Gy de rayon X ou γ.
Ces évaluations de fréquence sont faites à partir d'une relation linéaire, la plus pessimiste et donnant un risque maximal.
Les radiations ionisantes ont à la fois un effet initiateur et promoteur. Au cours de l'initiation, les rayonnements peuvent entraîner des altérations d'un ou de plusieurs oncogènes, la cancérogenèse se faisant par étapes successives. Peuvent également intervenir divers facteurs d'environnement, ou génétiques (rôle des systèmes de réparation…).
À la suite de l'explosion de la centrale de Tchernobyl, une très forte augmentation (facteur 10 à 100 selon les régions) de l'incidence des cancers de la thyroïde a été mise en évidence, notamment chez les enfants âgés de moins de 15 ans au moment de l'accident et habitant les zones fortement contaminées (Biélorussie, l'Ukraine et certaines régions de la Fédération de Russie). La dispersion d'iode radioactif (^{131}I essentiellement) dans l'environnement a provoqué chez ces enfants une exposition par inhalation, puis par ingestion via l'absorption de denrées contaminées (lait notamment).
Avec maintenant vingt ans de recul, les données concernant les leucémies et certaines tumeurs solides sont plus contestées, mais ne semblent pas montrer d'augmentation significative de l'incidence de ces pathologies.

4. Effets génétiques

Les rayonnements ionisants ont une action mutagène pouvant entraîner des mutations : dominantes, récessives, liées au sexe.

Les études sur les animaux, relativement anciennes, et les études épidémiologiques menées notamment sur les populations exposées après Hiroshima et Nagasaki n'ont pas montré une augmentation significative des pathologies héréditaires transmises sur un mode dominant. Toutefois, les progrès récents en génétique moléculaire montrent que les mutations induites seraient en majorité récessives, et ne seraient alors quantifiables qu'à la cinquième génération, c'est-à-dire à partir des années 2025-2030. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit qu'au-delà d'un certain niveau de dose, l'atteinte irréversible des cellules germinales ne permet plus de procréation, ce qui limite le risque génétique.

5. Effets tératogènes

Les effets varient en fonction du stade de développement. Avant la nidation, les effets sont de type « tout ou rien ». Pendant la période d'embryogenèse, avec un maximum de risque de la 3e semaine à la 6e semaine, des effets paraissent possibles chez l'homme à partir de 0,1 Gy.
Au stade fœtal (au-delà du 60e jour), la probabilité de malformation diminue. Persistent des risques d'atteinte du SNC (retard mental) et un risque de cancérogenèse probable. Le risque serait à considérer pour une dose supérieure à 0,1 Gy.

B. Irradiation interne

Elle est due à la pénétration dans l'organisme d'un radioélément par inhalation, blessure, ingestion, ou par voie transcutanée.
En irradiation externe il suffit de s'éloigner pour voir disparaître le risque. En cas d'irradiation interne, le risque est plus complexe, plusieurs paramètres intervenant.
Le danger va dépendre :

- de la qualité du rayonnement émis : les émetteurs α sont les plus dangereux au contact des organes cibles, car l'énergie du rayonnement sera dissipée dans un très faible volume entraînant un effet fortement ionisant ;
- de son énergie ;
- de sa période physique ou demi-vie ;
- de la période biologique, qui est le temps nécessaire pour que soit éliminée naturellement la moitié de la quantité du radioélément absorbé par une voie quelconque ;
- des propriétés métaboliques propres à cet élément, telle la concentration ou non dans un tissu ou organe particulier (cas de l'iode dans la thyroïde).

On définit ainsi une « période effective » qui est le temps au bout duquel l'activité a diminué de moitié, due à la fois à la période physique et biologique.

$$1/Te = 1/Tp + 1/Tb$$

Te = période effective, Tp = période physique, Tb = période biologique. Ainsi, un radioélément est d'autant plus dangereux que la période effective est longue et qu'il se fixe en un point particulier de l'organisme et que le rayonnement émis est plus ionisant ($\alpha > \beta > \gamma$).
Les radionucléides sont classés en fonction de leur radiotoxicité relative en quatre groupes (décret n° 88-521 du 18 avril 1988) : très forte radiotoxicité (certains

radio-isotopes du plutonium, uranium...), forte (^{131}I), modérée (^{14}C), faible (^{3}H). La dose délivrée dans l'organisme (appelée « dose engagée ») est calculée à partir de modèles sur une période de 50 ans chez l'adulte et jusqu'à 70 ans chez l'enfant.

V. Facteurs étiologiques

A. Irradiation naturelle

1. Sources externes d'origine extraterrestre

Les rayons cosmiques délivrent en moyenne en France une dose d'environ 0,3 mSv/an (30 mrem/an) pour l'homme ; cette dose varie avec la latitude et l'altitude. Elle double tous les 1 500 m.

2. Sources externes d'origine terrestre

- *Dans le sol* : il s'agit soit d'isotopes ayant des périodes très longues (potassium 40, uranium 238, thorium 232...) et leurs descendants, soit de radioéléments produits par l'action des rayonnements cosmiques. La dose moyenne délivrée est de l'ordre de 0,45 mSv/an et peut aller jusqu'à 2 mSv/an (200 mrem/an) dans certaines régions granitiques.
- *Dans l'air* : le radon, descendant de l'uranium et du thorium, peut délivrer des doses allant jusqu'à 1 mSv/an aux poumons.
- *Dans l'eau et les aliments* : exposition moyenne = 0,25 mSv/an (25 mrem/an).

3. Sources internes

Elles sont liées à la contamination de l'organisme par des radioéléments naturels de l'air, de l'eau, en particulier le ^{40}K.

B. Irradiation artificielle

1. Risques dans le domaine public

a) Irradiation médicale

C'est la deuxième source d'irradiation à laquelle nous sommes soumis, les rayons X et radio-isotopes étant utilisés de façon croissante en médecine. On distingue trois domaines.

■ *Radiothérapie*

Les doses sont très élevées. Utilisée en cancérologie, l'irradiation est généralement partielle et ne concerne qu'un petit nombre de malades sur l'ensemble de la population.

■ *Radioéléments*

Ils sont utilisés à des fins thérapeutiques et diagnostiques.

■ *Radiodiagnostic*

Il entraîne un risque moyen pour la population, faible mais dont il faut tenir compte. On peut considérer qu'il entraîne un doublement des doses apportées par l'irradiation naturelle.

b) Transport ou manipulation de sources radioactives

c) Rejets de déchets radioactifs

d) Retombées radioactives dues aux explosions

Tableau 4. Équivalents de dose moyens par individu/an.

	mSv
Irradiation naturelle	2,4
Irradiation médicale	1
Retombées des explosions nucléaires	0,02
Irradiation domestique	0,01
Industrie	0,01

2. Risques dans le domaine professionnel

a) Industrie nucléaire

Extraction des minerais, enrichissement, réacteurs nucléaires, retraitement, concentration et stockage…

b) Utilisation des radioéléments

En médecine, agriculture, industrie, par des sources scellées ou non scellées.

c) Utilisation des générateurs de rayonnements

Tubes de rayons X, accélérateurs de particules.

De nombreuses études épidémiologiques ont été effectuées sur ces diverses populations pour mettre en évidence des effets à long terme, en particulier cancérogènes :

- population de malades irradiés pour des pathologies non cancéreuses ;
- radiologues ;
- ouvriers peignant des cadrans de montres lumineuses.

Les affections provoquées par des expositions professionnelles aux radiations ionisantes sont couvertes par les tableaux des maladies professionnelles (n° 6 pour le régime général de la Sécurité sociale et n° 20 pour le régime agricole).

VI. Organisation de la radioprotection

Des limites ont été définies pour l'irradiation professionnelle et pour celle de la population. Aucun autre agent polluant n'a fait l'objet de telles mesures (décret n° 66-450 du 20 juin 1986, décret n° 75-306 du 28 avril 1975 modifié par le décret n° 88-662 du 6 mars 1988).
Trois directives Euratom (Communauté européenne de l'énergie atomique) constituent les textes de base à l'origine de la nouvelle réglementation française :

- directive 90/641/Euratom du 4 décembre 1990, qui concerne la protection opérationnelle des travailleurs extérieurs exposés à un risque de rayonnements ionisants (RI) au cours de leur intervention en zone contrôlée ;
- directive 96/29/Euratom du 13 mai 1996 (la plus importante), fixant les normes de base relatives à la protection sanitaire de la population et des travailleurs contre les dangers résultant de l'exposition aux RI ;
- directive 97/43/Euratom du 30 juin 1997, relative à la protection sanitaire des personnes contre les dangers des RI lors d'expositions à des fins médicales (en remplacement de la directive 84/466/Euratom).

Ces trois directives ont été transposées dans la réglementation française par l'ordonnance du 28 mars 2001 sous quatre aspects présentés dans le schéma ci-dessous. Ces transpositions impliquent des modifications à la fois du Code de la santé publique (CSP) et du Code du travail (CT), puisqu'elles traitent à la fois de la protection du public, des patients et des travailleurs :

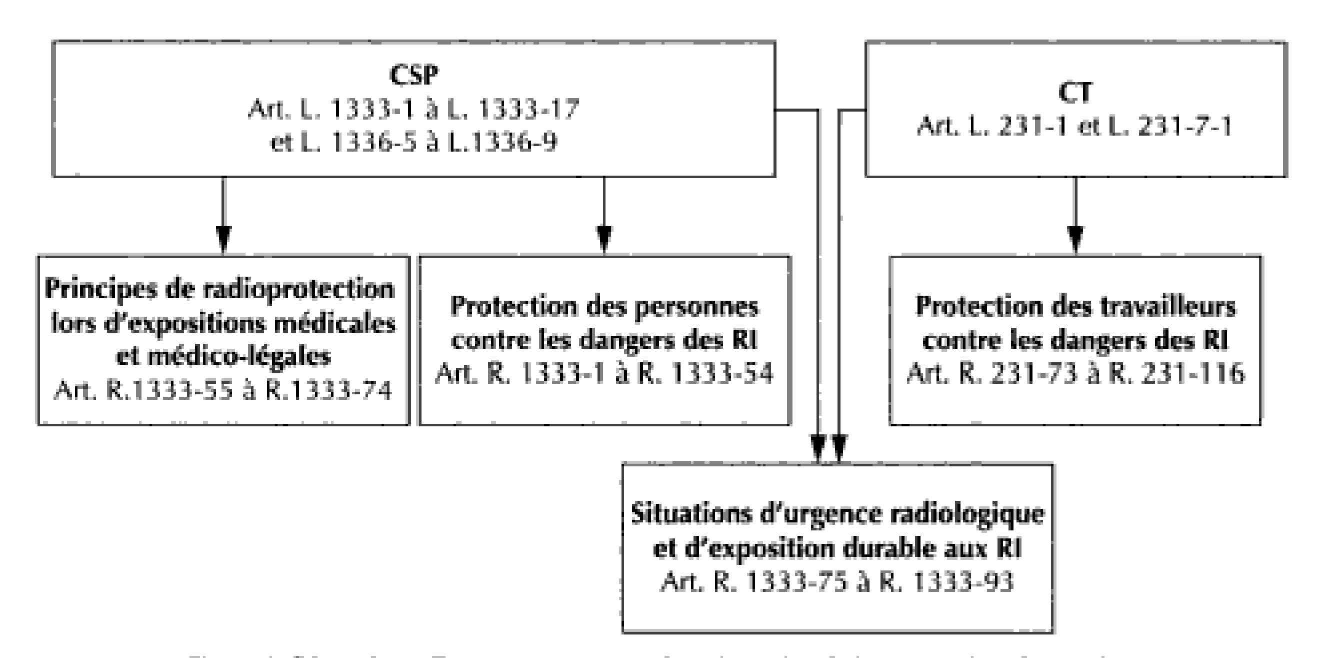


Figure 1. Directives Euratom transposées dans la réglementation française

Les normes découlent de la réglementation de la CIPR (Commission internationale pour la radioprotection) et ont pour but de garantir le respect des limites de dose, d'éviter l'emploi de sources d'exposition inutile et de contrôler les techniques utilisées.
On appelle « radioprotection » l'ensemble des mesures destinées à réaliser la protection sanitaire de la population et des travailleurs contre ces rayonnements et à

assurer le respect des normes de base. La radioprotection est un volet complémentaire de la protection des risques professionnels.

A. Législation

Du point de vue des normes on distingue en France trois groupes :
- travailleurs de catégorie A, ou directement affectés à des travaux sous rayonnement, c'est-à-dire travaillant habituellement en zone contrôlée (DATR), avec une exposition susceptible de dépasser 3/10 de la limite admissible sur 12 mois consécutifs. Les femmes enceintes ou allaitant et les jeunes de 16 à 18 ans ne peuvent être classés en catégorie A ;
- travailleurs de catégorie B, c'est-à-dire des travailleurs exposés n'entrant pas en catégorie A ;
- les personnes du public.

Tableau 5. Limites de doses en exposition externe (en vigueur depuis le 2 avril 2003 ; art. R. 231-76 et R. 231-77 du Code du travail).

Catégories	Irradiation	Dose maximale sur 12 mois consécutifs
A (DATR)	Globale Partielle Cristallin	20 mSv/an 500 mSv/an 150 mSv/an
B (non DATR)	Globale Partielle	6 mSv/an 3/10 valeurs de la cat. A
Public	Globale Partielle	1 mSv/an 1/10 valeurs de cat. A
Grossesse déclarée		< 1mSv dose équivalente au fœtus, de la déclaration de grossesse à l'accouchement
Femme allaitant		Interdiction de maintenir ou d'affecter à un poste avec risques d'exposition externe

Une législation particulière existe pour les CDD et le travail temporaire (arrêté du 8 octobre 1990 modifié et articles L. 122-3-17 et L. 124-22 du Code du travail).

1. Cas de l'exposition interne

On définit une LAI (limite annuelle d'incorporation) : il s'agit de l'activité (Bq/an) pour chacun des radionucléides qui, si elle était inhalée ou ingérée en une ou plusieurs fois au cours d'une année, conduirait à une dose engagée égale aux limites annuelles. On définit une LAI par ingestion et une LAI par inhalation.
La LDCA (limite de concentration dans l'air) est la concentration moyenne annuelle dans l'air en unité d'activité par volume qui, pour 2 000 heures de travail par an, entraîne une incorporation égale à la LAI par inhalation. Cela représente l'équivalent des CMA (concentrations maximales admissibles).
Il est important de noter que la limite de dose est annuelle. Peu importent les fluctuations possibles dans les doses ingérées.

2. Organisation des locaux

On distingue trois zones.

a) Zone contrôlée

Dans laquelle il y a des risques d'exposition annuelle supérieure à la dose tolérée d'où contrôle systématique de l'ambiance, des sources, de l'accès. Surveillance dosimétrique individuelle et médicale.

b) Zone surveillée

Proximité d'une zone contrôlée ou sources faibles, impose une dosimétrie et un respect des normes de circulation.

c) Zone réglementée

Ces zones sont signalées par un balisage.
Ces zones sont délimitées comme suit, selon l'arrêté du 15 mai 2006

Tableau 6. Zones réglementées.

	Dose efficace limite (corps entier)	Dose équivalente aux extrémités (dose susceptible d'être reçue en 1 heure)	Couleur du balisage
Zone non réglementée (public)	< 80 µSv/mois		
Zone surveillée	< 7,5 µSv/h	< 0,2 mSv/h	Bleue
Zone contrôlée	< 25 µSv/h	< 0,65 mSv/h	Verte
	< 2 mSv/h	< 50 mSv/h	Jaune
	< 100 mSv/h	< 2,5 Sv/h	Orange
	présence humaine interdite		Rouge

B. Moyens de protection

1. Réglementation

La personne doit être formée et parfaitement au courant des risques. Les gestes à effectuer lors des manipulations doivent être connus.

2. Dispositions techniques en cas d'exposition externe

Le rayonnement ne peut atteindre l'organisme que s'il est suffisamment pénétrant (neutrons, rayons γ).

a) Protection collective

Interposition d'écrans (mur de béton, piscine de désactivation, conteneurs en plomb…).

b) Protection individuelle

Elle comporte sur le lieu du travail la protection individuelle. Pour limiter l'atteinte de l'organisme il faut :

- limiter la durée d'exposition, éventuellement la fractionner ;
- travailler à distance (télémanipulateurs) ;
- utiliser des écrans adaptés à l'activité et à la nature de la source.

c) Protection en milieu contaminé

Protection collective :

- filtration de l'air par un circuit indépendant des autres pièces
- confinement de la source ;
- balisage des zones de travail, balisage des sources ;

Protection individuelle : tenues spéciales, port de gants jetables, de lunettes de protection, de tabliers…

C. Méthodes de surveillance et de contrôle

1. Contrôle collectif

Présence de détecteurs (débitmètres, dosimètres…) dans les zones contrôlées, prélèvements d'échantillons divers, surveillance de l'environnement. La contamination s'exprime en Bq/cm^2, ou en Bq/litre, ou Bq/m^3.

Mesure des débits de dose (débitmètres) dans l'environnement du travailleur ou provenant d'une contamination α ou β ou γ (détecteur α, compteur de Geiger Muller, compteur β).

Mesure des doses reçues par les personnes : dosimètres photographiques, dosimètres électriques à mesure directe. La dosimétrie opérationnelle est obligatoire depuis 2000 pour le personnel de catégorie A.

Traçabilité des sources et des déchets (registres).

2. Surveillance médicale

Recherche de contamination interne. Systématique ou sur incident par examen des urines ou des fèces, par mesure du rayonnement γ émis par le corps humain, qui renseigne avec une grande précision sur la nature et la quantité de radioélément présent dans l'organisme (anthropogammamétrie).

3. Irradiations accidentelles

L'expérience acquise à Tchernobyl a confirmé la fiabilité de la symptomatologie clinique précoce. Contrôle de la dose reçue par des examens sanguins et le caryotype. Traitement symptomatique sous surveillance médicale sévère et en service hospitalier spécialisé. Utilisation de la greffe de moelle dans des cas extrêmes.

4. Conduite à tenir en cas de contamination

a) Externe

Généralement par dépôt sur les téguments : après vérification grâce à un détecteur, on procède au besoin à un déshabillage suivi d'un lavage à l'eau savonneuse et d'un séchage soigneux, pour ne pas transformer la contamination externe en contamination interne.

b) Interne

Elle dépend du radionucléide, l'examen à l'anthropogammamètre permet de suivre l'élimination. Procéder à un lavage et décontamination locale :

- administration d'iode stable si contamination par iode radioactif ;
- aérosol de complexant type DTPA ;
- faire boire abondamment ;
- laxatif doux, fluidifiant bronchique ;
- conserver fèces et urine pour contrôle.

VII. Différentes instances impliquées dans la réglementation et la surveillance

Depuis février 2002, les missions de sûreté nucléaire et de radioprotection ne sont plus séparées. Un seul organisme, l'ASN, au travers de la DGSNR et de ses délégations régionales, assure ces missions. L'IRSN et des groupes permanents d'experts assurent l'appui technique.

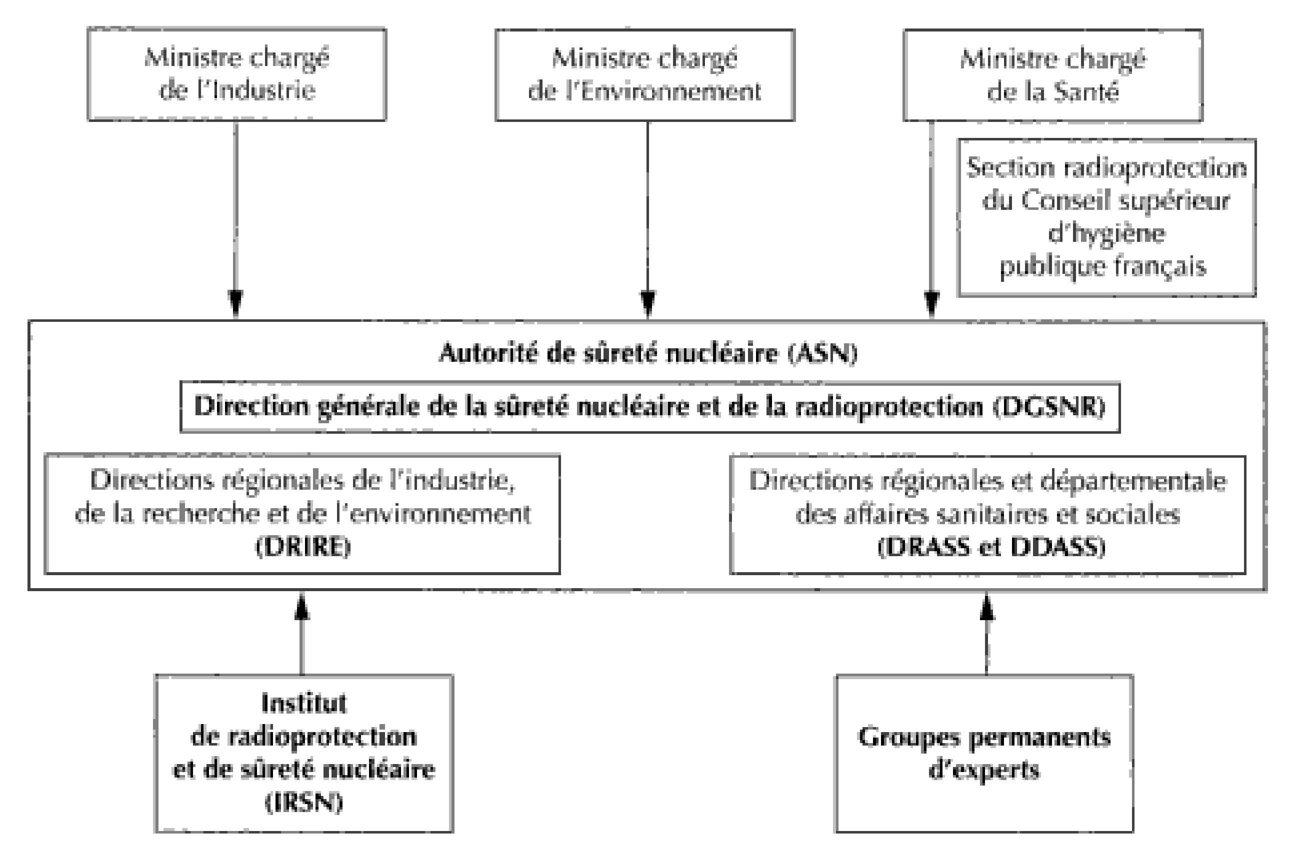


Figure 2. Instances impliquées dans la réglementation et la surveillance.

L'essentiel de la question

Les effets biologiques et pathologiques des rayonnements ionisants peuvent se manifester à la suite d'une irradiation externe, sur le trajet du rayonnement (essentiellement X ou γ, quelquefois β ou neutrons), ou d'une irradiation interne lorsqu'un radio-isotope pénètre dans l'organisme. Les émetteurs α sont dans ce dernier cas les plus dangereux.
Au-delà de certaines doses apparaissent des manifestations pathologiques, fonction de la dose reçue, du type de rayonnement et de la radiosensibilité de l'organe atteint. Les facteurs étiologiques peuvent être d'origine naturelle ou artificielle. Pour prévenir et limiter les risques, l'organisation de la radioprotection est très réglementée et soumise à de nombreuses directives.

Pour en savoir plus

- Académie des sciences. *Problèmes liés aux effets des faibles doses des radiations ionisantes.* Rapport n° 34. Tec & Doc, 1995.
- Delacroix D., Guerre J.-P., Leblanc P. *Guide pratique. Radionucléides et radioprotection. Manuel pour la manipulation des substances radioactives dans les laboratoires de faible et moyenne activité*, 4e éd. EDP Sciences, 2004.
- Gambini D.-J., Granier R. *Manuel pratique de radioprotection.* Tec & Doc/Lavoisier, 1997.
- *Tubiona M., Dutreix J., Wambersie A. et al. Radiobiologie.* Herman, 1986.
- Tubiona M., Jammet H. et Bertin M. Les rayonnements ionisants. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Intoxications maladies par agents physiques, 16510 A10 : 1-18.
- Tubiana M., Lallemand J. *Radiobiologie et radioprotection.* PUF, « Que sais-je ? », 2002.
- Décret n° 88-521 du 18 avril 1988 relatif aux principes généraux de protection contre les rayonnements ionisants.
- Décret n° 86-103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les RI.
- Directive 96/2/9 Euratom du 13 mai 1996.
- Documents INRS (disponibles sur le site Web de l'INRS) :
  - *Les rayonnements ionisants. Paysage institutionnel et réglementation applicable.* 2004 ; 1-72, ED 932.
  - *Les rayonnements ionisants. Prévention et maîtrise des risques.* 2006, 1-56, ED 958.
- Sites des principaux organismes français impliqués :
  - Autorité de sûreté nucléaire (ASN), www.asn.gouv.fr
  - Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), www.irsn.org
  - Legifrance (textes officiels), www.legifrance.gouv.fr

Mécanismes et manifestations de l'action toxique des xénobiotiques au niveau hématologique

M. PALLARDY, Service de Toxicologie et INSERM UMR749,
Faculté de Pharmacie, Paris XI.

Comparées aux autres types cellulaires de l'organisme, les cellules sanguines ont une courte durée de vie au niveau de la circulation (de 6 à 12 heures pour les polynucléaires neutrophiles à 120 jours pour les érythrocytes). En conséquence, il est important de considérer dans la toxicité hématologique à la fois les effets sur les cellules matures (érythrocytes, monocytes, polynucléaires, plaquettes) et sur l'hématopoïèse. La toxicité peut se manifester sous plusieurs formes : diminution du nombre de cellules circulantes, altérations fonctionnelles et structurales et plus rarement changements morphologiques. L'exposition peut être chronique ou aiguë et liée à l'environnement ou à la prise de médicaments. Un autre mode d'exposition est d'ordre professionnel avec l'exemple du benzène qui peut provoquer des aplasies médullaires irréversibles mais aussi des pathologies tumorales à partir des cellules hématologiques.
À ce titre un certain nombre de médicaments ont dû être retirés du marché pour des complications hématologiques : 1997 Centrago® (proxibarbal), thrombopénies ; 1996 Cantor® (minaprine), agranulocytose ; 1993 Tora-dol® (kétorolac), accidents hémorragiques ; 1992 Vigilor® (fixépide), cytopénies et hépatites ; 1991 Vasodistal® (cinépazide), agranulocytose ; 1988 : Catergene® (cianidanol), anémies hémolytiques immunoallergiques ; 1986 Alival® (nomifensine), anémies hémolytiques ; 1985 Upstene® (indalpine), agranulocytose et hépatites ; 1985 Tanderil® (oxyphenbutazone), agranulocytose et toxidermies bulleuses ; 1984 : Pyrazolés (phénylbutazone, formes injectables), agranulocytose et toxidermies bulleuses ; 1982 : Amidopyrine, toxicité hématologique.
Dans ce chapitre, ne sera considérée que la toxicité hématologique résultant d'une destruction ou d'une réduction des cellules du système hématologique (érythrocytes, leucocytes, plaquettes, progéniteurs hématopoïétiques, cellules souches). Les xénobiotiques provoquant une hypoxie par altération du transport de l'oxygène par l'hémoglobine (oxyde de carbone, poisons méthémoglobinisants) seront traités dans des chapitres différents.

I. Physiologie du système hématologique

A. Le système hématologique

Le système hématopoïétique est un ensemble de tissus disséminés dans la moelle osseuse, le thymus et les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, plaques de Peyer, rate, pharynx).
La moelle osseuse et le thymus sont des organes hématopoïétiques primaires. La moelle osseuse contient les cellules souches pluripotentes qui peuvent donner naissance aux progéniteurs hématopoïétiques. Ces progéniteurs donnent ensuite les cellules des différentes lignées : lymphoïdes à l'origine des lymphocytes T et B, myéloïdes à l'origine des érythrocytes, polynucléaires, monocytes, mastocytes et plaquettes. Le thymus est avant tout l'organe permettant la sélection (délétion des lymphocytes T auto-réactifs) et la maturation des précurseurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse en lymphocytes T matures.
Les ganglions lymphatiques, la rate et les autres systèmes sont des organes hématopoïétiques secondaires et possèdent une activité qui se borne à la lymphopoïèse. Néanmoins, dans certaines conditions pathologiques ou toxiques, ces organes peuvent acquérir un potentiel hématopoïétique complet.

Les premières cellules sanguines apparaissent au sein du mésoderme extraembryonnaire au cours de la 4e semaine de l'embryogenèse, puis les premiers foyers d'hématopoïèse sont retrouvés dans le foie dès le 2e mois. C'est le foie qui est le principal siège de l'hématopoïèse entre le 2e et le 7e mois. La moelle osseuse prend ensuite le relais et à la naissance, l'hématopoïèse se déroule entièrement dans cet organe. Au cours des 4e et 5e mois apparaît une myélopoïèse intrasplénique qui persiste jusqu'au 8e mois.

B. Hématopoïèse : importance de la cellule-souche

La production par la moelle osseuse des cellules différenciées (érythrocytes, polynucléaires, lymphocytes, plaquettes, monocytes) qui apparaissent dans le sang est le résultat d'un processus de prolifération et de différenciation. La régulation de cette production est organisée afin de respecter l'équilibre entre production et disparition des différentes cellules sanguines et pour répondre à des besoins exceptionnels ; destruction des érythrocytes dans le compartiment périphérique et anémie régénérative par exemple.

La moelle osseuse occupe les cavités médullaires des os. Sa masse est de 1 600 à 3 700 g chez l'adulte et représente environ 5 % du poids total. Seule la moelle rouge ou moelle active limitée aux épiphyses des fémurs et humérus, aux os du crâne, aux côtes, au sternum, aux omoplates, aux clavicules, aux vertèbres, au bassin et à la moitié supérieure du sacrum possède une activité hématopoïétique. La moelle jaune ou adipeuse ne présente pas d'activité hématopoïétique sauf en cas de besoin.

Le schéma de l'hématopoïèse s'organise à partir de trois catégories de constituants : les cellules hématopoïétiques, la trame de la moelle osseuse et les facteurs de régulation (en particulier les cytokines). Parmi les cellules hématopoïétiques, on distingue quatre compartiments : cellules souches pluripotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures représentant les éléments fonctionnels (*fig. 1*).

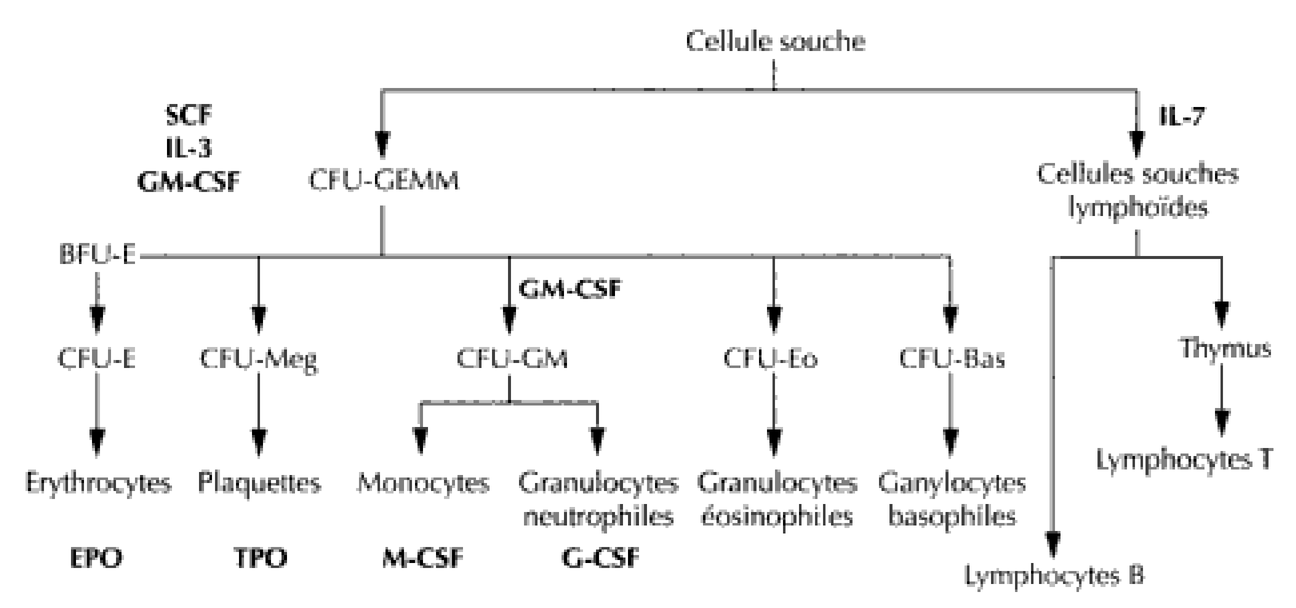


Figure 1. Schéma de l'hématopoïèse

Une cellule-souche pluripotente répond aux critères suivants : capacité d'autorenouvellement, capacité de se différencier pour donner naissance à l'ensemble des lignées lymphoïdes et myéloïdes, capacité de produire une restauration hématologique. À l'état normal, la cellule-souche prolifère très peu et le maintien de l'homéostasie est assuré par la prolifération et la différenciation des compartiments plus différenciés. En cas d'atteinte du compartiment central, ces cellules se différencient et ensuite prolifèrent pour reconstituer leur ensemble.
Chez l'homme, la cellule-souche pluripotente n'est pas encore identifiée. Une population de phénotype CD34+ thy-1^+, CD 33 a été isolée et considérée actuellement comme la plus primitive. Cette population blastique est capable en culture à long terme sur un stroma adéquat de donner une hématopoïèse normale. La destruction par des agents toxiques (irradiation, chimiothérapie, benzène...) de ces cellules souches aboutit à une aplasie médullaire irréversible.
Après plusieurs étapes mal connues, la cellule-souche aboutit à la formation de progéniteurs hématopoïétiques de différents types qui ont une moindre capacité d'autorenouvellement et qui peuvent se différencier dans plusieurs directions (*fig. 1*).
La prochaine étape est l'apparition des précurseurs hématopoïétiques qui sont les premières cellules morphologiquement reconnaissables et qui possèdent un faible pouvoir de prolifération. Le pro-érythroblaste donne naissance au globule rouge après les stades d'érythroblaste basophile, polychromatophile puis sans division supplémentaire d'érythroblastes acidophile et de réticulocyte. La présence de réticulocytes dans le sang circulant signe une anémie régénérative. Le myéloblaste aboutit au polynucléaire après les stades de promyélocyte, myélocyte puis sans division supplémentaire de métamyélocyte. Le mégacaryoblaste donne naissance aux plaquettes après endomitoses et fragmentation du cytoplasme.
Pour que l'hématopoïèse fonctionne normalement plusieurs facteurs sont nécessaires : le stroma ou tissu conjonctif de soutien composé de cellules (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules graisseuses, macrophages médullaires), la matrice extra-cellulaire (collagène, laminine, fibronectine, hémonectine, protéoglycanes) et de cytokines. Les principales cytokines impliquées sont le SCF (stem-cell factor), l'IL-3 (interleukine-3), le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), le G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), l'EPO (érythropoïétine), la TPO (thrombopoïétine) mais d'autres cytokines peuvent jouer un rôle additionnel. La plupart de ces cytokines sont produites par les macrophages tandis que l'érythropoïétine est produite par le rein sous la régulation entre autres de la PO_2.

C. Rôles des différentes sous-populations cellulaires

L'érythrocyte est une cellule anucléée, sans mitochondrie, dont la principale source d'énergie provient de la dégradation du glucose selon deux voies : la voie principale de glycolyse anaérobie et la voie accessoire qui assure une glycolyse aérobie. Cette cellule est un disque biconcave de 8 µm de diamètre capable de se déformer pour traverser des vaisseaux dont le calibre est inférieur à 3 µm. Sa durée de vie est d'environ 120 jours. Le principal rôle des érythrocytes ou globules rou-

ges est de transporter l'oxygène dans les tissus et le CO_2 dans les poumons. L'oxygène est transporté grâce à l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes. Le CO_2 est transporté sous forme dissoute mais surtout sous forme de bicarbonates via l'activité de l'anhydrase carbonique intracellulaire.

Tous les granulocytes ou polynucléaires ont un rôle important dans la défense contre les infections. Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules possédant un noyau polylobé et constituant 45 à 70 % des leucocytes en circulation. La fonction principale de ces cellules est de détruire et d'éliminer les agents pathogènes, notamment les bactéries après opsonisation (fixation d'anticorps ou de molécules du complément sur les bactéries) et phagocytose (ingestion des bactéries par formation de phagosomes). Une neutropénie sévère (moins de 500 neutrophiles/µl) peut conduire à des infections sévères. Les polynucléaires neutrophiles, nés dans la moelle osseuse sont en transit dans le sang avec un temps de séjour de 6 à 12 heures. Ils migrent ensuite à travers les vaisseaux vers les tissus où ils exercent leurs fonctions. Après 2 à 4 jours, ces cellules sont elles-mêmes détruites dans les tissus. Il existe un nombre de polynucléaires neutrophiles accolés à l'endothélium des capillaires veineux à peu près équivalent à celui des polynucléaires présents dans le sang ; ces neutrophiles dits marginalisés peuvent recirculer dans le sang ou émigrer irréversiblement dans les tissus. Les polynucléaires éosinophiles possèdent une faible activité bactéricide mais ont une activité antiparasitaire et antiallergique par libération d'histaminase et d'arylsulfatase. Leur durée de vie intratissulaire est de 10 jours environ et ils sont surtout présents dans les poumons, le tube digestif et la peau. Les polynucléaires basophiles ainsi que les mastocytes joueraient un rôle dans l'hypersensibilité immédiate via la libération de médiateurs comme histamine, l'héparine et les leucotriènes.

Les monocytes sont des phagocytes qui ne sont présents dans le sang que quelques heures pour ensuite migrer dans les tissus où ils se différencient en macrophages d'une durée de vie allant de plusieurs mois à plusieurs années. Ils font partie du système réticulo-endothélial que l'on retrouve dans la moelle osseuse, la rate, le foie (cellules de Kupffer), les alvéoles pulmonaires et le péritoine. Leur pouvoir de phagocytose est supérieur à celui des polynucléaires neutrophiles sauf pour les bactéries. De ce fait et au vu de leur localisation, ils ont un rôle central dans l'épuration de l'organisme des produits endogènes (protéines, cellules altérées…) ou exogènes (particules, antigènes, toxines).

Les lymphocytes sont le support cellulaire de la réponse immunitaire spécifique d'antigène et possèdent un rôle primordial dans la défense anti-infectieuse, antivirale et anti-tumorale. Ces cellules sont principalement retrouvées dans les formations lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer, pharynx…) et possèdent un grand pouvoir de prolifération après stimulation.

Les plaquettes sont des cellules anucléées dont le diamètre varie de 2 à 5 microns et jouent un rôle central dans l'hémostase primaire et l'arrêt des saignements. Après lésion endothéliale, les plaquettes et les facteurs de coagulation entrent en contact avec le collagène du tissu conjonctif ce qui provoque une adhésion plaquettaire. Ceci aboutit à la formation d'un thrombus qui est ensuite renforcé par un réseau de fibrine permettant la réparation définitive de la lésion. Une baisse significative du nombre de plaquettes est donc associée à un risque hémorragique.

II. Mécanismes de la cytotoxicité

A. Cytotoxicité directe (irradiation, chimiothérapie, benzène, mycotoxines)

Le premier mécanisme de cytotoxicité des cellules du système hématologique est une action directe du xénobiotique ou d'un de ses métabolites. Dans le cas des cellules nucléées et des agents endommageants l'ADN (radioactivité, chimiothérapie anticancéreuse), un des mécanismes de toxicité directe est la mort par apoptose. L'apoptose est une forme active de mort cellulaire au cours de laquelle on observe morphologiquement une diminution du volume cellulaire, une condensation de la chromatine en périphérie du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique, la formation de corps apoptotiques et la phagocytose par une cellule avoisinante. Dans ce type de mort cellulaire, la membrane cellulaire reste intacte par opposition à la nécrose. Le produit du gène *p53*, la protéine P53, jouerait un rôle clé dans ce type de cytotoxicité induite par ces agents.
Le compartiment hématopoïétique est particulièrement sensible aux effets de ces agents du fait du pourcentage important de cellules en prolifération. Parmi les molécules de chimiothérapie les plus toxiques pour le compartiment hématologique on retrouve : agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérases (doxorubicine, etc.), mitoxanthrone, mitomycine…
La toxicité directe peut-être aussi liée à la production de métabolites toxiques comme dans le cas du benzène. Le benzène donne naissance après métabolisation dans le foie par le cyt P-450 2E1 à un métabolite qui est l'hydroquinone. Ce métabolite est ensuite transformé directement dans la moelle osseuse en radical phénoxyl par la prostaglandine H synthétase ou la myéloperoxydase présentes au niveau du stroma de la moelle et des leucocytes. Ce radical phénoxyl, très réactif, va être responsable de la destruction des cellules de la moelle osseuse.

B. Hémolyse oxydative des érythrocytes

Un stress oxydatif sévère peut conduire à une hémolyse. Le globule rouge est bien protégé contre le stress oxydatif ce qui est indispensable pour assurer sa survie face à la tendance oxydative due aux mouvements de l'oxygène. La superoxydedismutase (SOD) permet la transformation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé constamment à faible concentration est dégradé par la catalase en même temps que la glutathion peroxydase permet l'oxydation du glutathion réduit (GSH). Le GSH est ensuite régénéré par action de la GSH réductase avec consommation de NADPH, H^+ qui est fourni par la voie des pentoses et intervention de la glucose-6-phosphatedéshydrogénase (G6PD). Par ailleurs, la vitamine E protège les lipides membranaires de l'effet de H_2O_2 et la méthémoglobine réductase intervient dans la réduction de la méthémoglobine.
Lorsque le globule rouge est soumis à un stress oxydatif sévère par addition d'un produit oxydant (phénylhydrazine, aniline, nitrobenzène, phénacétine, chlorate, les molécules aromatiques contenant un groupement amino, nitro ou hydroxy),

on peut retrouver une hémolyse toxique liée à une lipoperoxydation de la membrane cellulaire, une oxydation des protéines membranaires et une destruction de la membrane de l'érythrocyte. Des changements structuraux de l'hémoglobine peuvent aussi contribuer à une hémolyse avec dénaturation, précipitation et association covalente par des ponts disulfures à la membrane des érythrocytes. Ces précipités d'hémoglobine dénaturée sont appelés corps de Heinz et peuvent être responsables de modifications de perméabilité avec lyse cellulaire, changement de morphologie et phagocytose prématurée de ces érythrocytes par les macrophages de la rate.

Les personnes qui ont un déficit en G6PD sont extrêmement susceptibles à un stress oxydatif du fait du rôle central de cette enzyme dans l'énergétique du globule rouge. Ce déficit touche plus de 100 millions de personnes dans le monde avec une répartition préférentielle chez les Noirs Africains et les populations du pourtour méditerranéen. Le déficit qui est généralement asymptomatique peut être déclenché par l'absorption d'antipaludéens (primaquine), de sulfamides, de nitrofuranes, d'acide nalixidique, d'analgésiques antipyrétiques, de quinidine ou d'aliments (fèves).

C. Origine immunologique

Les molécules chimiques sont souvent d'une masse moléculaire inférieure à 1 000 Da et de ce fait, ne sont pas immunogéniques ; ce sont des haptènes. Pour qu'une réaction immunitaire dirigée contre un xénobiotique se développe, il est nécessaire que celui-ci se couple à une protéine porteuse soluble ou se fixe sur une protéine de la membrane cellulaire (plaquettes, érythrocytes, polynucléaires) pour être reconnu par le système immunitaire. Dans les deux cas, le développement d'une réponse immunitaire contre la molécule introduite aboutit à la production d'anticorps anti-molécule mais les mécanismes ne sont pas identiques.

Dans le cas d'une fixation de la molécule sur une protéine membranaire lorsque celle-ci est réintroduite, les anticorps anti-molécule se fixent sur la molécule aboutissant à une destruction cellulaire dans la rate. Ce cas de figure est retrouvé pour les anémies hémolytiques induites par la pénicilline où les patients traités avec de fortes doses développent souvent des IgM mais surtout des IgG anti-pénicilline responsables des anémies hémolytiques. Les érythrocytes recouverts d'IgG anti-pénicilline sont détruits dans la rate. Pour la pénicilline, ces anémies peuvent apparaître après 7 jours de traitement chez des patients recevant pour la première fois cet antibiotique et avec une cinétique beaucoup plus rapide chez des patients ayant déjà des anticorps anti-pénicilline circulants. La rifampicine se fixe sur la membrane des plaquettes provoquant une dégradation plus rapide des plaquettes après fixation des anticorps antirifampicine.

Dans le cas de la formation de complexes-immuns (molécule-anticorps), les xénobiotiques concernés ont souvent une faible affinité pour les cellules cibles et seulement des faibles doses sont nécessaires pour provoquer la cytotoxicité. La destruction cellulaire intervient après fixation irréversible du complexe-immun sur la membrane cellulaire et activation du complément. Les complexes-immuns peuvent migrer d'une cellule à l'autre. L'hémolyse peut avoir lieu dans le compartiment intravasculaire. Ce type de mécanisme est retrouvé pour la destruction des érythrocytes et des plaquettes induite par la quinine et la quinidine. L'aminopyrine

et la noramidopyrine provoquent la destruction des granulocytes. L'agranulocytose provoquée par un traitement par ces molécules résulte de la production d'anticorps antimédicament avec leuco-agglutination massive. Ces « agglutinats » sont ensuite détruits au niveau de la circulation pulmonaire induisant une hyperplasie compensatrice de la moelle osseuse. Si la prise de médicament est poursuivie, la moelle osseuse est atteinte. De plus, la destruction massive des granulocytes provoque une forte fièvre. Les accidents à la noramidopyrine sont rares mais mortels dans 10 % des cas et les agranulocytoses sont imprévisibles et non reliées à la dose.
Une cytotoxicité cellulaire peut aussi avoir lieu via une réaction auto-immune. Le meilleur exemple est celui de la méthyldopa qui provoque la production d'anticorps d'isotype IgG dirigés contre des déterminants Rhésus de la membrane des érythrocytes. Ces anticorps sont retrouvés chez 10 % des personnes traitées par ce médicament anti-hypertenseur mais seulement 1 % des patients font une hémolyse.
Le diagnostic de ces cytopénies d'origine immunologique peut être effectué par un test de Coombs direct qui évalue la sensibilisation des hématies par une immunoglobuline ou par des fractions du complément ou par un test de Coombs indirect qui permet la recherche d'auto-anticorps libres dans le plasma.

D. Pseudoneutropénie : adhésion sur l'endothélium vasculaire

L'histamine, les dextrans, les glucocorticoïdes, et le fer inorganique provoquent une pseudoneutropénie par adhésion des granulocytes sur l'endothélium vasculaire. Le pool de cellules circulantes diminue mais le nombre de cellules sanguines reste le même. L'adrénaline provoque l'effet contraire avec démargination et augmentation du nombre de granulocytes circulants.

III. Conséquences cliniques et biologiques d'une atteinte hématologique

A. Conséquences des atteintes des différents compartiments cellulaires

Les anémies hémolytiques avec baisse importante du nombre d'érythrocytes provoquent une pâleur cutanéo-muqueuse, une asthénie, une dyspnée d'effort, des signes d'hypoxie cérébrale (bourdonnements d'oreilles, « mouches volantes ») et une tachycardie réflexe. Les hémolyses intravasculaires donnent lieu à un malaise intense, de la fièvre, des frissons, des douleurs lombaires ou abdominales, des céphalées et une insuffisance rénale aiguë.
Les principaux signes biologiques observés après destruction des érythrocytes sont liés à la destruction globulaire et à la régénération médullaire. La destruction globulaire entraîne une baisse du nombre d'érythrocytes, de l'hémoglobine et de l'hématocrite, une diminution de l'haptoglobine, une augmentation de la bilirubine libre correspondant au catabolisme de l'hème et une hémoglobinurie respon-

sable de l'insuffisance rénale. La présence de réticulocytes au niveau du compartiment périphérique signe une régénération médullaire.
Une baisse significative du nombre de plaquettes entraîne un syndrome hémorragique avec allongement du temps de saignement. Les hémorragies se retrouvent principalement au niveau de la peau (pétéchies), du rein, de la rétine et du cerveau.
La baisse du nombre de granulocytes est surtout délétère dans le cas des polynucléaires neutrophiles avec augmentation de l'incidence des infections à bactéries à multiplication extracellulaire (streptocoques, staphylocoques, enterobacter, pseudomonas, E. coli...). Si la baisse du nombre de polynucléaires neutrophiles est importante (< 500 par mm^3), les foyers d'infection sont d'origine endogène (flore intestinale ou cutanée).

B. Au niveau de la moelle osseuse

L'action au niveau central peut atteindre toutes les lignées cellulaires (effet sur la cellule-souche ou sur des progéniteurs précoces) ou seulement une d'entre elles.
Les agents alkylants (nitrosourées, melphalan, cyclophosphamide, ifosfamide, chlorambucil) employés en chimiothérapie anticancéreuse possèdent une forte toxicité hématologique. Ces produits peuvent entraîner une destruction de la cellule-souche avec pour conséquence une aplasie médullaire irréversible. Du fait de cette toxicité, ces produits doivent être administrés sous forme de cures en respectant un temps suffisant entre les cures pour préserver l'intégrité du compartiment hématologique central.
L'irradiation provoque aussi une aplasie médullaire irréversible.
Les agents inhibant la synthèse de l'ADN (anti-prolifératifs) provoquent l'apparition d'une anémie mégaloblastique caractérisée par une augmentation de la taille des érythroblastes, des métamyélocytes et des mégacaryocytes. Le nombre de cellules du compartiment périphérique est réduit, la taille des érythrocytes est augmentée (macrocytose) et les polynucléaires neutrophiles sont hypersegmentés (5 lobes ou plus). Les produits agissant sur le métabolisme des folates (méthotrexate) et de la vitamine B12 (néomycine) qui jouent un rôle important dans la synthèse de l'ADN peuvent induire ce type de phénomène. Les autres inhibiteurs de la synthèse de l'ADN connus pour provoquer des anémies mégaloblastiques sont : les antagonistes pyrimidiques (hydroxyurée, 5-fluorouracile, cytosinearabinoside) et puriques (azathioprine, 6-mercaptopurine).
Les agents inhibant la synthèse de l'hème comme l'isoniazide ou le plomb peuvent induire une anémie sidéroblastique caractérisée par un dépôt de fer autour du noyau des érythroblastes prélevés dans la moelle osseuse.

C. Syndromes prolifératifs

Les données épidémiologiques montrent une augmentation de l'incidence d'hémopathies malignes après exposition à long terme à certains produits chimiques. Le plus connu de ces produits est le benzène. L'exposition au benzène provoque l'apparition de leucémies aiguës myéloïdes souvent précédées par une pancytopénie. Des lymphomes et des myélomes ont aussi été retrouvés après exposition au benzène.

D'autres produits comme l'oxyde d'éthylène, les métaux lourds, le pentachlorophénol, le styrène et le chlorure de vinyle ont aussi été retrouvés associés à une augmentation de l'incidence d'hémopathies malignes.

Pour en savoir plus

- Hématologie. *Précis des maladies du sang*. Eds A Najman, E Verdy, G Potron, F Isnard. Ellipses 1994.
- Burant P, Vest P, Ceppa F, Betscoun S, Desideri-Vaillant C, Vigezzi J.-F. *Les anémies hémolytiques*. Lyon Pharmaceutique 1998 ; 49 : 10-22.
- Casarett & Doull's. *Toxicology. The basic science of poisons*. 5th Edition. Ed C Klaassen. Mc Graw Hill 2001.
- Toxicology. *Principles and applications*. Eds RJM Niesink, J de Vries, MA Hollinger. CRC Press 1996.

Traitement des intoxications

N. FOUILHÉ SAM-LAÏ, K.-A. DINH-VAN, V. DANEL
Unité de toxicologie clinique, Centre hospitalier universitaire, Grenoble.

Les intoxications représentent une pathologie fréquente, le plus souvent accidentelle chez l'enfant, et volontaire chez l'adulte.
Les principes du traitement des intoxications ont beaucoup évolué dans la dernière décennie, passant d'une attitude systématique (par exemple, le lavage gastrique) à des thérapeutiques fondées sur une évaluation la plus précise possible du bénéfice apporté.
Le traitement des intoxications associe le plus souvent un traitement symptomatique à un traitement évacuateur et/ou épurateur et/ou antidotique.

I. Traitement symptomatique

Il est toujours prioritaire et comporte le traitement des défaillances vitales (en particulier respiratoires et circulatoires), des convulsions, d'une hyperthermie sévère, etc.

II. Traitement évacuateur et de décontamination

Il vise à diminuer la pénétration du toxique dans l'organisme.

A. Décontamination cutanée et oculaire

1. Décontamination cutanée

Une décontamination cutanée (irrigation cutanée à l'eau, sans délai, pendant au moins 15 minutes) doit être réalisée en urgence, si possible sur le lieu de l'exposition sinon dès l'admission à l'hôpital, en cas d'exposition cutanée à des produits susceptibles d'induire des lésions cutanées (acides, alcalins, corrosifs, phénols, solvants, décapants…) ou d'être résorbés par voie cutanée et ainsi d'entraîner des intoxications systémiques (solvants, alcools, nitriles, insecticides, acide fluorhydrique…).

2. Décontamination oculaire

La décontamination oculaire répond aux mêmes indications : irrigation oculaire à l'eau entreprise sans délai et poursuivie pendant 15 minutes au moins et plus dans les cas graves, avec une eau à 15 °C et un jet doux à 15 cm de l'œil (« règle des 15 »).

B. Décontamination gastro-intestinale

Pendant plusieurs décennies, toute ingestion de toxique (notamment médicamenteux) conduisait à la réalisation d'un lavage gastrique, et cela parfois sans tenir compte du type de molécule et de la quantité ingérée.

Dans les années 1980, la « redécouverte » du charbon activé a entraîné une utilisation quasi systématique de celui-ci, cette fois encore peu adaptée aux circonstances de l'intoxication. L'intérêt de la décontamination digestive a été ensuite rediscuté.
La conférence de consensus de la Société de réanimation de langue française (SRLF, 1992) ainsi que les plus récentes prises de position communes de l'American Academy of Clinical Toxicology (AACT) et de l'European Association of Poison Centres and Clinical Toxicologists (EAPCCT) depuis 1997 permettent de mieux préciser la place respective des différentes méthodes d'épuration digestive.
Différentes techniques de décontamination gastro-intestinale peuvent être utilisées, mais l'essentiel est le bénéfice réel apporté en répondant aux questions suivantes : quelle est la quantité de toxique soustraite de l'organisme ? Quel est le bénéfice attendu chez le patient ? Avec quelles complications ?
La mortalité globale par intoxication étant faible (< 1 % en milieu hospitalier), le clinicien doit identifier les patients présentant un risque vital potentiel et qui devraient bénéficier d'une décontamination gastro-intestinale.

1. Sirop d'ipéca

Le sirop d'ipéca, extrait de la racine d'une plante, *Cephalis ipecacuanha*, contient deux alcaloïdes émétisants. Il n'a plus d'indication aujourd'hui.

2. Lavage gastrique

Le lavage gastrique, réalisé dans plus de 75 % des intoxications médicamenteuses dans les années 1980, n'est actuellement à considérer qu'en cas d'ingestion très récente (< 1 heure) d'une quantité de substance toxique susceptible d'engager le pronostic vital ; même dans ce cas, son efficacité n'est pas prouvée. Des contre-indications sont à respecter : patient comateux non intubé, ingestion de caustiques, d'hydrocarbures pétroliers ou de produits moussants.

3. Dose unique de charbon activé

Le charbon activé (CA) est une forme très poreuse de charbon traité pour augmenter sa surface d'adsorption à plus de 1 500 m^2/g. Le charbon activé adsorbe les toxiques dans le tube digestif, diminuant leur absorption et réduisant ou prévenant leur toxicité systémique. Un grand nombre de substances sont adsorbables par le charbon activé mais certaines ne le sont pas (*tab. 1*). L'administration de charbon activé par voie orale (Carbomix®, Toxicarb®) peut être envisagée en cas d'ingestion récente depuis moins d'une heure d'une quantité toxique d'une substance carbo-adsorbable.

Tableau 1. Substances non adsorbées par le charbon activé

Acides et bases fortes Alcools et glycols Cyanures Fer et métaux	Sels ionisés : – calcium – chlorates – chlorure de sodium, de potassium – lithium – magnésium

Il faut préciser les points suivants :
- le charbon activé entraîne une réduction variable de l'absorption du toxique chez l'animal ;
- son efficacité diminue avec le temps : chez les volontaires (la plupart des études ayant été réalisées avec des doses thérapeutiques de médicaments), on obtenait 88,6 % de réduction de la quantité de toxique absorbée quand le charbon était administré 30 minutes après, et seulement 37 % s'il était administré 60 min après. Les études cliniques sont peu concluantes ;
- la dose préconisée est de 50 g chez l'adulte et 1 g/kg chez l'enfant, sans dépasser 50 g ;
- son administration est contre-indiquée lorsqu'il existe des troubles de conscience, des antécédents digestifs ou quand il peut aggraver le risque de survenue d'une pneumopathie d'inhalation ;
- les complications pouvant survenir après administration de charbon activé sont : les vomissements (fréquents), la pneumopathie d'inhalation (pouvant être redoutable), de rares cas d'abrasion cornéenne (après vomissements).

4. Purgatifs

Les laxatifs osmotiques diminuent l'absorption du toxique en accélérant son expulsion du tube digestif. Les études expérimentales montrent que les purgatifs seuls ont peu d'intérêt et que l'association de laxatifs et de charbon activé semble plus efficace. Cependant, il n'y a actuellement aucune indication définie pour leur utilisation.

5. Irrigation intestinale

Cette technique consiste en l'administration entérale, par sonde nasogastrique, de grandes quantités d'une solution de polyéthylène glycol (PM 4000, type Fortrans®) équilibrée en électrolytes, qui permet de réduire l'absorption du toxique en expulsant le contenu intraluminal intestinal.
La dose exacte à administrer n'est pas déterminée. La dose recommandée est de :
- 500 mL/h chez l'enfant de moins de 6 ans ;
- 1 000 mL/h entre 6 et 12 ans ;
- 1 500 à 2 000 mL/h chez l'adulte.

Les contre-indications sont : la perforation ou l'obstruction intestinale, l'hémorragie gastro-intestinale, des voies aériennes non protégées en cas de troubles de conscience, une instabilité hémodynamique, des vomissements incoercibles.
Les complications les plus fréquentes sont les troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales) et la pneumopathie d'inhalation.
Il n'y a pas d'indications établies mais l'irrigation intestinale peut être intéressante lors d'ingestion de toxiques à libération prolongée, précocement dans l'intoxication au paraquat ou en cas d'ingestion de grandes quantités de fer. L'ingestion de sachets de drogues illicites ainsi que l'ingestion de grandes quantités de toxiques non adsorbés par le charbon activé sont des indications théoriques à discuter.
En résumé, la décontamination digestive a des indications peu nombreuses si l'on tient compte du délai d'administration très court nécessaire à son éventuelle effica-

cité. Il n'est pas justifié de remplacer le lavage gastrique par l'administration systématique de charbon activé. Le quasi-abandon du lavage gastrique et l'administration ponctuelle de charbon activé n'ont pas modifié au cours des dernières années, dans un sens défavorable, la morbidité et la mortalité des intoxications aiguës.

III. Traitement épurateur

Son objectif est d'augmenter l'élimination des toxiques déjà présents dans l'organisme. Ses indications sont actuellement peu nombreuses.

A. Diurèse forcée aqueuse

La diurèse forcée aqueuse (diurèse > 3 L/24 h), très utilisée dans les dernières décennies, a pour principe d'augmenter l'élimination du toxique en diminuant sa concentration dans le liquide tubulaire rénal et son gradient de réabsorption. Compte tenu de l'inactivation hépatique de la majorité des xénobiotiques, elle n'a en réalité plus d'indication.

B. Diurèse alcaline

La diurèse alcaline permet d'augmenter l'élimination des acides faibles et de diminuer l'acidose induite par certains toxiques. Elle consiste en l'administration de 4 à 5 L/24 h de solutés isotoniques dont un tiers de soluté bicarbonaté à 1,4 %, ce qui permet d'élever le pH urinaire à 7,5 ou 8. Elle nécessite une surveillance clinique et biologique stricte (pour éviter certaines complications comme insuffisance cardiaque, œdème cérébral…).
Les indications actuelles sont : les intoxications sévères par phénobarbital, aspirine et herbicides chlorophénoxy.

C. Diurèse saline

L'intoxication au lithium reste théoriquement une indication de la diurèse saline car elle limite la réabsorption tubulaire du lithium. Elle nécessite l'apport de 3 à 4 litres de solutés isotoniques dont la moitié de sérum physiologique, et ne s'envisage que sous surveillance clinique et biologique attentive, car elle expose aux risques de surcharge sodée et d'hypernatrémie. Si l'intérêt d'une bonne hydratation semble prouvé, l'utilité réelle de la diurèse saline dans l'intoxication au lithium est controversée (*voir « Hémodialyse »*).

D. Hémodialyse

Cette technique repose sur la diffusion à travers une membrane semi-perméable de substances à faible poids moléculaire (PM), hydrosolubles, faiblement liées aux protéines.

L'hémodialyse (HD) est efficace dans les intoxications par :

- le méthanol : il est aisément dialysable ainsi que son métabolite, l'acide formique. Un traitement antidotique par un inhibiteur des alcool-déshydrogénases (fomépizole ou éthanol) doit être systématiquement associé pour empêcher la formation de métabolites toxiques. Le recours à l'hémodialyse est envisagé s'il existe : une acidose métabolique avec pH < 7,25, un taux de bicarbonates < 15 mmol/L, un trou anionique > 30 mmol/L, des troubles visuels ou un coma, une méthanolémie > 0,5 g/L, un taux de formates sanguin > 200 mg/L ;
- l'éthylène glycol : l'élimination de ce toxique par hémodialyse est 10 fois supérieure à la clairance rénale normale. Un traitement antidotique (*idem* méthanol) doit être associé. L'hémodialyse sera indiquée s'il existe les mêmes perturbations biologiques que précédemment, une insuffisance rénale entravant son élimination ainsi que celle de ses métabolites, un taux d'éthylène glycol plasmatique > 1 g/L ;
- le lithium : la clairance d'hémodialyse est environ 5 à 10 fois la clairance rénale normale. Au décours de l'hémodialyse, on observe souvent un effet rebond dû au relargage du lithium du secteur cellulaire vers le secteur extracellulaire, rendant nécessaire la répétition des séances d'épuration. En pratique, l'indication d'hémodialyse doit être déterminée sur des critères cinétiques (évolution de la lithiémie, demi-vie sérique, quantité éliminée par le rein) : elle est indiquée en présence d'une intoxication sévère avec coma, convulsions ou détresse respiratoire, une demi-vie sérique augmentée avec diminution de l'élimination rénale. Elle serait plus bénéfique dans le cas d'intoxication aiguë sur prise chronique ou d'intoxication chronique.

D'autres indications peuvent être discutées :

- l'acide acétylsalicylique : l'hémodialyse élimine efficacement l'aspirine et ses métabolites ; elle permet en plus de corriger l'acidose métabolique présente dans les intoxications graves ;
- les acides chlorophénoxy : la clairance d'hémodialyse est intéressante mais l'alcalinisation urinaire paraît tout aussi efficace ;
- la procaïnamide : l'hémodialyse est efficace mais n'est utilisée qu'en cas d'insuffisance rénale car la clairance spontanée est satisfaisante ;
- le glyphosate : la clairance d'hémodialyse est identique à la clairance rénale, donc l'indication n'existe qu'en cas d'insuffisance rénale. Cependant, malgré la bonne épuration du glyphosate, le pronostic de ces intoxications n'est pas modifié par l'hémodialyse ; en effet, la toxicité des herbicides contenant du glyphosate semble être essentiellement due aux adjuvants corrosifs entrant dans leur composition ;
- l'acide borique et les borates : l'hémodialyse augmente l'élimination de ces deux toxiques mais ces intoxications sont rares ;
- les bromures : l'efficacité de l'hémodialyse a été prouvée avec passage de la demi-vie d'élimination de 10 jours à 2 heures ;
- la metformine : l'hémodialyse est efficace dans le traitement de l'acidose métabolique.

Pour certains autres toxiques (paraquat, métaux lourds, cardiotropes...), l'hémodialyse ne semble modifier ni la symptomatologie, ni le pronostic.

En dehors des indications toxicologiques, l'hémodialyse a un intérêt dans le traitement de certaines complications des intoxications (insuffisance rénale, acidose métabolique, hyperkaliémie...) mais elle est parfois mal tolérée si l'hémodynamique du patient est précaire.

E. Doses répétées de charbon activé

L'administration répétée de charbon activé par voie orale a pour but d'augmenter l'élimination de toxiques carbo-adsorbables présents dans l'organisme à des concentrations toxiques. Elle est particulièrement recommandée en cas d'absorption de médicaments ayant une demi-vie longue et un petit volume de distribution ou ayant un cycle entéro-hépatique ou entéro-entérique. Les études animales et chez le volontaire ont montré que cette méthode augmentait significativement l'élimination du toxique, en réduisant la demi-vie de celui-ci et en augmentant la clairance corporelle totale. Mais il n'y a pas d'études contrôlées et pas de diminution de la morbidité ou de la mortalité prouvée.

Les études cliniques ont montré :

- que les valeurs de clairance obtenues par l'administration de doses répétées de charbon activé dans les intoxications à la théophylline, à la quinine, à la dapsone sont comparables à celles obtenues par l'hémodialyse, voire supérieures dans les intoxications à la carbamazépine et au phénobarbital ;
- que, pour l'aspirine, les données ne sont pas suffisantes pour le recommander ;
- que la clairance totale de la digoxine était augmentée mais sans preuve d'une efficacité clinique en raison de son grand volume de distribution ;
- une inefficacité pour les molécules suivantes : antidépresseurs tricycliques, méprobamate, méthotrexate, phénytoïne, acide valproïque.

La dose optimale n'est pas déterminée, mais une dose initiale de 50 à 100 g de charbon activé suivie par environ 12,5 g/h (ou 50 g/4 h) est recommandée chez l'adulte, 10 à 25 g chez l'enfant, suivi de 0,5 g/kg/4 h. L'administration horaire semble avoir un effet cinétique supérieur et être mieux tolérée que l'administration espacée.

Les contre-indications absolues sont : voies aériennes non protégées et troubles de la conscience, occlusion intestinale, non-intégrité du tube digestif. Une diminution du péristaltisme (d'origine médicamenteuse ou non) est une contre-indication relative.

Les complications décrites sont les suivantes : constipation provisoire, occlusion intestinale, vomissements, pneumopathie d'inhalation. La co-administration de purgatifs n'est pas recommandée.

L'administration de doses répétées de charbon activé est à envisager si le patient a ingéré une dose potentiellement létale de carbamazépine, de phénobarbital, de dapsone, de quinine ou de théophylline pouvant faire envisager le recours à des techniques invasives d'épuration extrarénale.

Un cas particulier est celui de l'intoxication au paraquat, où l'administration d'un adsorbant (charbon activé ou terre à Foulon) est préconisée, même s'il n'y a pas de preuve clinique de son efficacité.

IV. Antidotes

Les intoxications aiguës ou chroniques nécessitent toujours, et parfois uniquement, un traitement symptomatique. Celui-ci peut s'accompagner d'un traitement antidotique.

Par rapport au nombre de molécules pouvant être impliquées dans une intoxication, le nombre d'antidotes existant est relativement réduit. L'utilisation d'un antidote concerne moins de 5 % des patients hospitalisés pour intoxication. En présence d'une intoxication, l'indication d'un traitement par antidote doit tenir compte de la cinétique de l'antidote par rapport à celle du toxique (demi-vie, voies d'élimination…), de son mode d'administration ainsi que de ses possibles effets secondaires. De plus, l'efficacité des antidotes est variable : certains peuvent modifier l'évolution clinique, d'autres ne vont constituer qu'une thérapeutique d'appoint. Ils posent, d'autre part, le problème de leur disponibilité, de leur conservation, de leur péremption et de leur coût. Cependant, grâce à une meilleure connaissance de la physiologie des intoxications et à l'apport de la toxicocinétique, ces dernières décennies ont été marquées par la réévaluation de l'efficacité d'antidotes connus et par la découverte de nouvelles molécules. Le pronostic de certaines intoxications (paracétamol, digitaliques) a ainsi été transformé.

A. Définition

Un antidote est un médicament dont l'action spécifique est capable soit de modifier la cinétique du toxique, soit d'en diminuer les effets au niveau des récepteurs ou des cibles spécifiques, et dont l'utilisation améliore le pronostic vital ou fonctionnel de l'intoxication ou en facilite la prise en charge.

B. Antidotes et modes d'action

Plusieurs types d'action sont possibles (*fig. 1*).

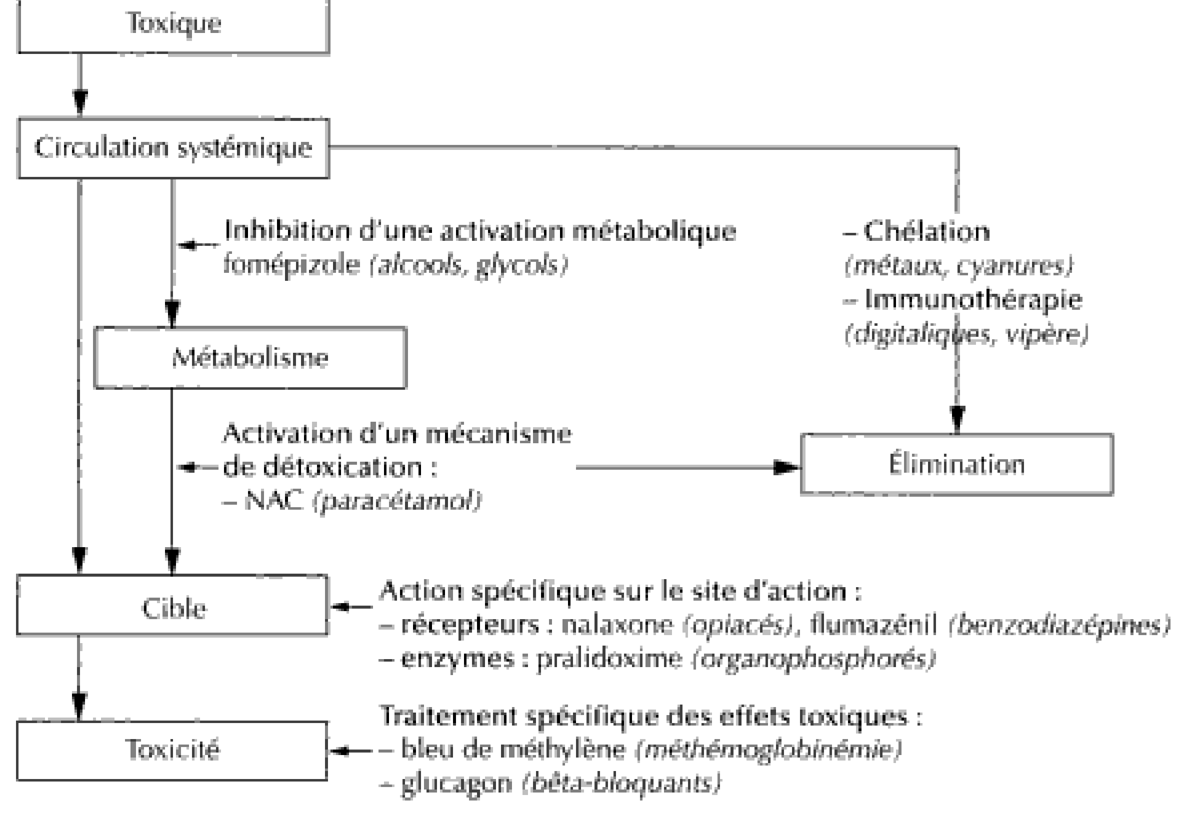


Figure 1. Mécanisme d'action des antidotes

1. Modification de la toxicocinétique

L'antidote « empêche » le toxique d'atteindre sa « cible » (*tab. 2*) :

- en limitant la résorption du toxique par adsorption ou formation de complexes insolubles (sels de calcium) éliminés par les fèces ;
- en neutralisant le toxique dans le compartiment sanguin (chélateurs des métaux, hydroxocobalamine, immunothérapie des digitaliques) ; le toxique devient inerte et facilement éliminable par l'émonctoire rénal ;
- en inhibant une voie métabolique conduisant à un métabolite toxique (fomépizole et éthanol) ;
- en favorisant une voie naturelle de détoxication (N-acétylcystéine).

Tableau 2. Antidotes agissant par modification de la toxicocinétique du toxique

Acide édétique sel dicobaltique	Fomépizole
Calcium édétate de sodium	Fragments Fab d'anticorps antidigitaliques
Déféroxamine	Hydroxocobalamine
Dimercaprol	Immunsérum antivenin de vipère
D-pénicillamine	N-acétylcystéine
Éthanol	Succimer

a) Hydroxocobalamine (vitamine B12, Cyanokit®)

Mode d'action : complexation des ions cyanures sous forme de cyanocobalamine atoxique. L'hydroxocobalamine restaure l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Indications : intoxication aux cyanures et aux fumées d'incendie (parallèlement à l'administration d'oxygène). *Contre-indication relative :* hypersensibilité connue à la vitamine B12 (à évaluer par rapport au risque vital).

Effets indésirables : risque allergique (rare dans cette indication), coloration rose des téguments et des urines. La tolérance générale est excellente.

Posologie : le kit contient 2 flacons de 2,5 g d'hydroxocobalamine à diluer. Dose initiale de 5 g (70 mg/kg chez l'adulte et l'enfant) en intraveineux pendant 30 minutes, à répéter une ou deux fois en fonction de l'état clinique (si collapsus).

b) Fragments Fab d'anticorps antidigitaliques (Digidot®)

Mode d'action : fragments Fab purifiés résultant de l'immunisation de moutons contre un complexe digoxine/albumine. Ils se fixent sur la fraction génine du cardiotoxique rendue ainsi inactive. L'administration de ces fragments permet souvent de corriger les problèmes vitaux de l'intoxication : troubles de conduction, arythmies et hyperkaliémie, choc cardiogénique.

Indications : intoxication aiguë par digoxine ou ses dérivés, surdosage digitalique avec signes de gravité (âge, existence d'une cardiopathie antérieure, troubles de conduction, troubles du rythme, hyperkaliémie), intoxications par plantes contenant des glycosides cardiotoniques (digitale, laurier-rose…), intoxication par préparations à base de crapauds du genre Bufo. La concentration sanguine de digitaliques, même élevée, n'est pas un critère d'utilisation des anticorps ; elle permet néanmoins et chaque fois que possible de confirmer l'intoxication avant l'utilisation d'un traitement coûteux.

Effets indésirables : réactions d'hypersensibilité en raison de l'origine ovine, exacerbation d'une décompensation cardiaque chez les patients traités habituellement par digitaliques.
Posologie : un flacon de 80 mg neutralise 1 mg de digoxine. Le calcul de la dose à administrer en cas d'intoxication aiguë ou de surdosage est complexe et controversé, aboutissant souvent à l'administration de 4 à 10 flacons. Compte tenu du coût de cet antidote, il semble plus raisonnable de proposer de se fournir une quantité suffisante d'anticorps et d'administrer deux flacons en 15 à 30 minutes par voie intraveineuse, à renouveler dans l'heure, une à plusieurs fois si nécessaire en fonction de la réponse clinique.

c) Immunsérum antivenin de vipères (Viperfav®)

Mode d'action : fragments F(ab')2 d'immunoglobulines équines antivenimeuses de vipères européennes.
Indications : envenimations par vipères européennes (grade 2 ou 3).
Effets indésirables rares : réaction allergique immédiate (dyspnée, urticaire, choc anaphylactique rare) ou retardée (maladie sérique).
Posologie : flacon de 4 mL (réservé à l'usage hospitalier) à administrer par voie intraveineuse après dilution dans 100 mL de soluté isotonique, à perfuser en 1 heure (chez l'adulte et l'enfant, quels que soient l'âge et le poids). Peut être renouvelé 2 fois à 5 heures d'intervalle en fonction de l'évolution clinique. Toutefois, les données cliniques actuelles et la demi-vie d'élimination du venin (8 h) permettent de penser qu'une seule dose de 4 mL suffit dans la quasi-totalité des cas.

d) Acide édétique sel dicobaltique (Kélocyanor®)

Mode d'action : forme avec les ions cyanures des complexes stables éliminés dans les urines.
Indications : intoxication cyanhydrique aiguë confirmée. En France, dans cette indication, l'utilisation de l'hydroxocobalamine moins toxique est recommandée. Néanmoins, le faible coût de l'acide édétique sel dicobaltique peut justifier son utilisation dans les cas d'intoxication collective avérée.
Effets indésirables : troubles digestifs, sudation, hypotension, hypertension, troubles du rythme cardiaque, œdème de la face, réactions allergiques. Les effets indésirables, en particulier cardiovasculaires, sont d'autant plus importants que l'intoxication est modérée ou inexistante, en raison de la toxicité du cobalt seul, non complexé au cyanure.
Administration : injection par voie IV suivie de l'administration de glucose.

e) Succimer (Succicaptal®)

Mode d'action : formation avec les métaux de complexes stables hydrosolubles, éliminés dans les urines.
Indications : intoxication par le plomb (surtout chez l'enfant en raison de la voie d'administration orale), le mercure, l'arsenic.
Effets indésirables : troubles digestifs, urticaire, éosinophilie, augmentation des transaminases, vertiges, céphalées, paresthésies.

f) Calcium édétate de sodium ou EDTA calcique (Calcium édétate de sodium Serb®)

Mode d'action : formation avec les métaux de complexes stables hydrosolubles, éliminés dans les urines.
Indications : intoxication par le plomb. Utilisation pour le test de plomburie provoquée (permet d'indiquer, avec la plombémie, le traitement chélateur chez l'adulte) et pour le traitement chélateur chez l'adulte et l'enfant.
Effets indésirables : si perfusion trop rapide : céphalées, vomissements, fièvre, congestion nasale, malaise général, hypotension artérielle. Risques allergiques et de survenue de nécrose tubulaire rénale.

g) Déféroxamine (Desféral®)

Mode d'action : agent chélateur des cations trivalents et des cations divalents (avec une plus faible affinité). La déféroxamine est capable de fixer le fer libre du plasma ou des cellules pour former le complexe ferroxamine, éliminé dans les urines qu'il colore en rouge orangé.
Indications : intoxication au fer (et à l'aluminium).
Effets indésirables : flush, urticaire, tachycardie, hypotension, choc, céphalées, nausées, altération de la vision et de l'audition, augmentation de la sensibilité aux infections, détresse respiratoire lors de perfusions prolongées à fortes doses, insuffisance rénale.

h) Dimercaprol (BAL® ou « British Antilewisite »)

Mode d'action : le dimercaprol a une plus grande affinité que les protéines pour l'arsenic, le mercure ou l'or, et forme avec ces derniers des composés stables excrétés dans les urines.
Indications : intoxications aiguës par l'arsenic, le mercure, l'or, le zinc, le cuivre, l'antimoine. Intoxication sévère au plomb en association avec l'EDTA calcique.
Effets indésirables : HTA, tachycardie, céphalées, nausées, douleur au point d'injection (car solution huileuse contenant cependant de la butacaïne). Contre-indication relative en cas d'allergie à l'arachide.

i) D-pénicillamine (Trolovol®)

Mode d'action : chélate le cuivre sérique.
Indications : intoxication au cuivre, mais aussi mercure, cadmium.
Effets indésirables : troubles digestifs, éruption cutanée, prurit, protéinurie, insuffisance rénale, thrombopénie, pneumopathie interstitielle, atteintes auto-immunes (myasthénie, lupus induit…).

j) Fomépizole (Fomépizole AP-HP®)

Mode d'action : dérivé pyrazolé qui agit par inhibition de l'alcool déshydrogénase, bloquant la production de métabolites toxiques.
Indications : intoxication à l'éthylène glycol et au méthanol, et éventuellement aux autres alcools toxiques (hors AMM).
Effets indésirables : troubles digestifs, prurit, urticaire, augmentation transitoire des transaminases et des créatine-kinases. Globalement, les effets secondaires sont rares.
Posologie : dose initiale de 15 mg/kg, suivie de 10 mg/kg/12 h, en perfusion IV. Ce produit est dialysable, nécessitant une adaptation thérapeutique pendant la séance

d'hémodialyse. L'utilisation chez l'enfant (quoique rare) est possible actuellement hors AMM ; la posologie rapportée au poids est comparable à celle de l'adulte.

k) Éthanol (Curéthyl®)

Mode d'action : agit par saturation de l'alcool déshydrogénase hépatique, empêchant la formation de métabolites toxiques. Avantageusement remplacé par le fomépizole.
Indications : intoxication à l'éthylène glycol, au méthanol.
Effets indésirables : hypoglycémie, gastrite hémorragique, acidose métabolique, convulsions... En raison des troubles neurologiques que l'éthanol peut entraîner, la surveillance clinique du patient est difficile et son utilisation délicate chez l'enfant.
Administration : par voie IV, jusqu'à obtention d'une alcoolémie entre 1 et 2 g/L, concentration nécessaire pour être efficace, nécessitant une adaptation en cas d'hémodialyse. L'alcoolémie doit être dosée régulièrement au cours du traitement.

l) N-acétylcystéine (NAC, Fluimucil®)

Mode d'action : la NAC apporte dans le plasma de la cystéine, précurseur du glutathion intracellulaire. Le glutathion est capable de neutraliser le métabolite cytotoxique (N-acétyl-P-benzoquinoneimine ou NAPBQI) issu de la biotransformation du paracétamol par la voie des cytochromes P450. Lors d'une intoxication, le glutathion est consommé : la NAC permet de reconstituer le stock de glutathion. Elle aurait également un rôle cytoprotecteur hépatique non spécifique en s'opposant aux lésions oxydatives induites par certains toxiques.
Indications : administration la plus précoce possible après ingestion d'une dose hépatotoxique de paracétamol (≥ 150 mg/kg chez l'adulte, ≥ 100 mg/kg chez l'enfant) ; à discuter en cas d'intoxication par d'autres hépatotoxiques (chloroforme, tétrachlorure de carbone, syndrome phalloïdien). L'indication d'administration de la NAC doit être posée en fonction de la paracétamolémie, effectuée en urgence, et reportée sur le nomogramme prédictif de Prescott (*fig. 2*). En cas de

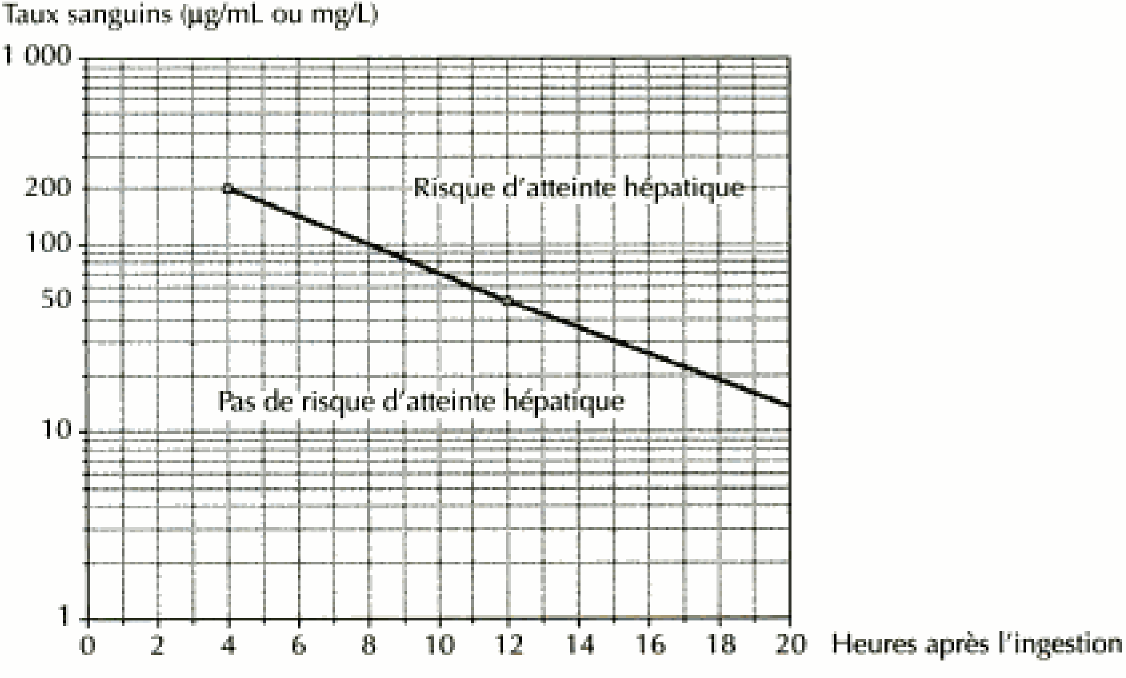


Figure 2. Nomogramme de Prescott. Toxicité hépatique du paracétamol en fonction du dosage sanguin (échelle semi-logarithmique)

prise en charge tardive (> 8 heures après ingestion d'une dose toxique), la NAC devra être administrée sans attendre les résultats de la paracétamolémie.
Effets indésirables : rash cutané, bronchospasme, choc anaphylactoïde (rare). Ces manifestations sont plus fréquentes en cas de perfusion rapide de la dose de charge et/ou si l'indication n'est pas justifiée.
Posologie : 300 mg/kg/j au total, en perfusion IV, répartis en 150 mg/kg sur 60 minutes, puis 50 mg/kg sur les 4 heures suivantes, et enfin 100 mg/kg sur les 16 heures suivantes. En cas d'administration *per os*, la dose initiale est de 140 mg/kg en solution diluée puis 70 mg/kg/4 heures (17 fois). Le traitement *per os* est aussi efficace que la voie IV : il présente comme inconvénients une administration difficile en cas de vomissements et une durée plus longue du traitement (72 heures).

2. Modification de la toxicodynamie

L'antidote s'oppose aux effets du toxique au niveau de récepteurs spécifiques (*tab. 3*) :
- en déplaçant le toxique de son récepteur par un antagoniste spécifique (naloxone, flumazénil) ;
- par manipulation de la constante d'affinité (oxygène hyperbare) ;
- par réactivation d'un récepteur enzymatique (oximes).

Tableau 3. Antidotes agissant par modification de la toxicodynamie du toxique

Flumazénil	Naloxone	Oxygène	Pralidoxime

a) Flumazénil (Anexate®, Flumazénil Dakota Pharm®)

Mode d'action : antagoniste compétitif spécifique des récepteurs centraux aux benzodiazépines.
Indications : intoxication pure aux benzodiazépines ou aux imidazopyridines (zolpidem, zopiclone). Il peut être une aide au diagnostic d'un coma ou de troubles neuropsychiques inexpliqués, d'une dépression respiratoire, en particulier chez le sujet âgé.
Contre-indications et précautions : intoxication concomitante aux antidépresseurs tricycliques ou à d'autres médicaments abaissant le seuil épileptogène (risque de convulsions). Sa demi-vie courte expose en cas d'administration unique à une nouvelle aggravation des troubles de conscience et de la dépression respiratoire. L'utilisation chez un intoxiqué dépendant expose au risque de syndrome de sevrage (convulsions) et nécessite une titration. Il peut être utilisé en injections intraveineuses discontinues ou en perfusion intraveineuse continue.
Effets indésirables : nausées, vomissements, possibilité d'anxiété et de palpitations en cas d'injection trop rapide, risque de syndrome de sevrage et de convulsions en cas de traitement aux benzodiazépines à doses élevées et/ou de façon prolongée.
Posologie :
- adulte : 0,3 mg en IV, dose à répéter minute après minute jusqu'à l'obtention de signes de réveil franc et levée de la dépression respiratoire sans dépasser 2 mg. En l'absence d'effet après l'administration de 2 mg, on considère que ce n'est pas une intoxication aux benzodiazépines ;
- enfant : 0,01 mg/kg en IV lente toutes les deux minutes jusqu'à obtention de signes de réveil.

b) Naloxone (Narcan®, Nalone®, Naloxone Merck®)

Mode d'action : antagoniste compétitif spécifique des récepteurs aux opiacés.
Indications : diagnostic et traitement de l'intoxication aux opiacés (héroïne, morphine…, peu ou pas efficace sur la buprénorphine, le dextropropoxyphène), traitement de la dépression respiratoire due aux opiacés.
Effets indésirables : vomissements à fortes doses, frissons, agitation. En raison de sa demi-vie courte, risque de nouvelle dépression respiratoire (remorphinisation), risque également de syndrome de sevrage nécessitant une titration.
Posologie : 1 ampoule (1 mL = 0,4 mg) à diluer dans 9 mL de solution physiologique, à administrer à doses progressives de 0,1 mg toutes les 2-3 minutes (0,01 à 0,03 mg/kg chez l'enfant) jusqu'à 2 mg voire au maximum 10 mg, en fonction de l'effet sur la fréquence respiratoire ; au-delà, la dépression respiratoire n'est probablement pas due aux seuls opiacés.

c) Oxygène

Mode d'action : accélère la vitesse de dissociation de la carboxyhémoglobine.
Indications : oxygène normobare dans l'intoxication aiguë par le monoxyde de carbone (CO) et les cyanures ; oxygène hyperbare dans l'intoxication par le CO si grossesse, coma et/ou perte de connaissance.
Effets indésirables : sécheresse buccale et nasale, crises convulsives.
Administration :

- oxygène normobare : administré pendant 12 heures à un débit de 6 L/min et jusqu'à disparition des symptômes dans l'intoxication par le CO ;
- oxygène hyperbare : administré dans un centre d'hyperbarie, au mieux dans les 6 heures après l'exposition au CO.

d) Pralidoxime (Contrathion®)

Mode d'action : réactive les cholinestérases en se fixant sur le groupement alkylphosphate du complexe organophosphoré-cholinestérase.
Indications : à utiliser en association avec l'atropine dans les intoxications aux insecticides organophosphorés anticholinestérasiques et aux neurotoxiques organophosphorés (sarin, tabun, soman…). La pralidoxime n'est pas utile avec les carbamates insecticides car la liaison avec l'acétylcholinestérase est rapidement et spontanément réversible.
Effets indésirables : tachycardie, laryngospasme, vertiges, céphalées, vision floue, augmentation de la pression artérielle, diplopie, élévation transitoire des enzymes hépatiques.
Posologie : dose de charge 200 à 400 mg pouvant aller jusqu'à 2 g en perfusion intraveineuse de 30 minutes (enfant : 20 à 40 mg/kg) puis dose d'entretien 8 à 10 mg/kg/h. Durée du traitement : 4 à 6 jours et jusqu'à 3 semaines dans certains cas.

3. Traitement « spécifique » des effets du toxique

L'antidote « corrige » de façon spécifique les effets du toxique (*tab. 4*) :

- en aval du site d'action : atropine, glucose, bleu de méthylène… ;
- en court-circuitant la liaison toxique-récepteur : glucagon (bêtabloquants).

Tableau 4. Antidotes traitant spécifiquement les effets du toxique

Atropine sulfate	Gluconate de calcium
Bleu de méthylène	Phytoménadione
Complexe prothrombinique humain (PPSB)	Pyridoxine
Diazépam	Sels de sodium molaires
Glucagon	Tropatépine

a) Atropine sulfate

Mode d'action : antispasmodique anticholinergique.
Indications : intoxications par insecticides organophosphorés ou carbamates anticholinestérasiques, médicaments parasympathomimétiques, digoxine, intoxications aux champignons (syndrome muscarinique), neurotoxiques organophosphorés (gaz sarin, soman, tabun… proches des insecticides organophosphorés).
Effets indésirables : sécheresse buccale, tachycardie, troubles de l'accommodation, rétention urinaire, agitation, confusion mentale.
Administration : posologie variable selon le toxique et la gravité de l'intoxication. Administrations répétées en IV lente jusqu'à régression de l'hypersécrétion trachéo-bronchique et correction de la bradycardie.

b) Sels de sodium molaires

Mode d'action : les sels de sodium ont une action directe sur le courant sodique, à la phase initiale du potentiel d'action des cellules myocardiques.
Indications : intoxication par tous les produits ayant un effet stabilisant de membrane (élargissement du complexe QRS, troubles de conduction, collapsus) : antidépresseurs tricycliques et tétracycliques, antiarythmiques de classe I, chloroquine, dextropropoxyphène. L'indication habituelle est l'association de troubles de conduction intraventriculaires à des troubles hémodynamiques.
Effets indésirables : hypokaliémie, alcalose métabolique, surcharge sodée.
Administration : solutions de bicarbonate 8,4 % et lactate 11,2 %. Perfusion IV lente sur une bonne voie veineuse (soluté hypertonique) avec apport de KCl.

c) Bleu de méthylène (chlorure de méthylthioninium)

Mode d'action : agit comme cofacteur dans la réduction intra-érythrocytaire de la méthémoglobine, en présence de NADPH, chez les sujets non déficients en G6PD.
Indications : méthémoglobinémie lors d'une intoxication aux nitrates, nitrites, aniline, etc. Le bleu de méthylène est à administrer en présence de symptômes d'hypoxie et/ou d'une méthémoglobinémie ≥ 30 %.
Effets indésirables : nausées, vomissements, douleurs abdominales, céphalées, vertiges, dyspnée, anémie hémolytique. Le bleu de méthylène est lui-même un agent oxydant donc méthémoglobinisant à fortes doses.
Administration : par voie IV. Dose initiale à répéter si besoin. Le critère d'arrêt ou de poursuite du traitement est le pourcentage de méthémoglobinémie.

d) Diazépam

Le diazépam est une benzodiazépine surtout utilisée comme anticonvulsivant. Il est indiqué dans la prévention et le traitement des crises convulsives d'origine

toxique : isoniazide, antidépresseurs tricycliques, phénothiazines, psychostimulants (amphétamines, cocaïne, ecstasy, théophylline, caféine, éphédrine…), rodenticides (strychnine, chloralose, crimidine…), anesthésiques locaux, chélateurs (déféroxamine, D-pénicillamine…).
À signaler l'intérêt actuellement controversé du diazépam intraveineux dans le traitement de l'intoxication sévère à la chloroquine.

e) Gluconate de calcium

Mode d'action : en présence de fluor, forme un sel de fluorure inactif.
Indications : brûlures par acide fluorhydrique (HF), hypocalcémie compliquant des brûlures cutanées étendues par HF ou en cas d'ingestion d'HF. Sur des bases expérimentales, il a été proposé (comme le chlorure de calcium) dans les intoxications aux inhibiteurs calciques (effet inotrope positif transitoire) sans que l'efficacité n'ait été démontrée en clinique humaine.
Effets indésirables : hypercalcémie, arythmie cardiaque (troubles du rythme en cas de prise concomitante de digitaliques), constipation.
Administration : solution à 10 % ou gel à 2,5 % (AP-HP). La forme gel à 2,5 % est adaptée aux brûlures cutanées (le plus souvent digitales) : ce traitement doit être appliqué le plus rapidement possible (après décontamination à l'eau), plusieurs fois par jour et ce, pendant plusieurs jours. Le traitement des brûlures digitales peut nécessiter l'administration de gluconate de calcium par voie IV ou intra-artérielle : dans ces cas, le contrôle régulier de la calcémie et de l'ECG est indispensable. De même, en cas de brûlures cutanées étendues ou lors d'ingestion, le pronostic vital peut être engagé par la survenue d'une hypocalcémie nécessitant l'administration de gluconate de calcium par voie IV (sous contrôle de la calcémie et de l'ECG). Les brûlures oculaires peuvent nécessiter l'administration intraoculaire de gluconate dilué (solution à 1 %).

f) Phytoménadione (Vitamine K1 Roche®)

Mode d'action : facteur indispensable à la synthèse hépatique de plusieurs protéines de la coagulation.
Indications : hypoprothrombinémie (surdosage en antivitamine K médicamenteux, intoxications par raticides anticoagulants ou plantes contenant des dérivés coumariniques (grande férule)).
Effets indésirables : réaction d'hypersensibilité.
Administration : 10 à 20 mg en IV sur 1 heure (± en association avec des facteurs de coagulation injectables) en cas de surdosage médicamenteux, et de 50 à 100 mg/j *per os* puis 50 mg/j à répéter selon la valeur du taux de prothrombine (TP) en cas d'intoxication aux raticides anticoagulants avec un TP < 60 % (INR < 3). Dans le cas d'ingestion de raticide fortement concentré en solution huileuse, l'administration de vitamine K peut être nécessaire pendant plusieurs semaines. L'administration de vitamine K n'est pas reprise lorsque le TP reste supérieur à 60 % 48 heures après l'arrêt du traitement.

g) Complexe prothrombinique humain : PPBS (Kaskadil®)

Mode d'action : fraction plasmatique contenant les facteurs de complexe prothrombinique (facteurs II, VII, IX et X) qui corrige rapidement les troubles de la coagulation.

Indications : surdosage ou intoxication par les antivitamines K.
Effets indésirables : réactions allergiques.
Posologie : en général, une administration en IV de 20 à 30 UI/kg de PPSB (exprimées en unités de facteur IX) est suffisante en attendant les 4 à 6 heures de délai d'action de la vitamine K1 prescrite simultanément.

h) Tropatépine (Lepticur®)

Mode d'action : anticholinergique de synthèse agissant par antagonisme des effets muscariniques de l'acétylcholine au niveau central et périphérique.
Indications : syndrome extrapyramidal des neuroleptiques, plus fréquemment dyskinésies au métoclopramide.
Effets indésirables : effets atropiniques dose-dépendants (tachycardie, rétention urinaire, sécheresse de la bouche...). Contre-indiqué pendant la grossesse.
Posologie : 10 à 20 mg/j en IM ou IV lente (pas de dose définie dans cette indication chez l'enfant, à adapter en fonction du poids).

i) Pyridoxine

Mode d'action : la pyridoxine est un cofacteur intervenant dans de nombreuses réactions enzymatiques du métabolisme des acides aminés.
Indications : intoxication par isoniazide (INH), gyromitre (champignon), hydrazines.
Effets indésirables : tachypnée, neuropathie périphérique, convulsions (à fortes doses).
Posologie : quand la dose ingérée est connue, la dose usuelle est d'un gramme par gramme de INH ingéré. Quand la dose ingérée est inconnue, administration de 5 g (70 mg/kg chez l'enfant) à répéter en cas de coma ou convulsions jusqu'à cessation des convulsions. Des doses moindres ont été utilisées dans les autres intoxications.

j) Glucagon (Glucagen®)

Mode d'action : hormone hyperglycémiante qui stimule la synthèse des catécholamines, effet inotrope et chronotrope positif par activation d'une adénylate cyclase différente de celle couplée au récepteur bêta.
Indications : intoxication aux bêtabloquants, aux anticalciques, aux antidiabétiques. En pratique, son efficacité sur le plan cardiovasculaire est variable, n'excluant pas le recours aux vasopresseurs.
Effets indésirables : réactions allergiques, troubles digestifs, tachycardie, hypoglycémie.

C. Autres produits

Certains « antidotes » semblent intéressants, mais n'ont actuellement pas fait la preuve de leur efficacité. Les circonstances de leur utilisation devraient être rigoureusement notées afin d'aider à leur évaluation et validation éventuelles. On peut citer :

- L-carnitine (Lévocarnil®) : en cas d'intoxication sévère au valproate de sodium ou valpromide (Dépamide®) avec troubles neurologiques et hyperammoniémie. La molécule d'acide valproïque est proche de celle des acides gras, avec lesquels elle entre en compétition pour son transport, sa métabolisation et son élimina-

tion. En cas d'intoxication, le transporteur, la carnitine, devient insuffisant et le métabolisme de l'acide valproïque est dévié vers une ω-oxydation entraînant une production de lactates, une hyperammoniémie et un coma. L'administration de L-carnitine pourrait restaurer le métabolisme initial ;

- insuline-glucose : intoxications par les inhibiteurs calciques et les antiarythmiques. Les propriétés inotropes de l'insuline, par augmentation du substrat énergétique myocardique, ont été démontrées chez l'animal et dans certaines circonstances chez l'homme. Des travaux chez le chien et quelques cas rapportés chez l'homme ont montré que de fortes doses d'insuline (> 1 UI/kg/h), associées à une perfusion continue de sérum glucosé (maintien d'une glycémie normale), amélioraient l'inotropisme en cas d'intoxication à certains cardiotropes. À utiliser précocement, le plus souvent en association avec des catécholamines ;
- octréotide (Sandostatine®) : intoxication aux sulfamides hypoglycémiants, en cas d'échec de l'administration de glucose à fortes doses. L'octréotide inhibe la sécrétion d'insuline au niveau des cellules pancréatiques, optimisant la charge en sucre ;
- silibinine (Légalon Sil®) : syndrome phalloïdien. La silibinine est le principal composé de la silymarine extraite du chardon Marie ; elle limiterait le transport intra-hépatocytaire des amatoxines et aurait une action bénéfique sur l'ARN polymérase.

L'essentiel de la question

Les traitements antidotiques ont connu un regain d'intérêt ces dernières années. Grâce à ces traitements spécifiques, certaines intoxications ont vu leur pronostic transformé et d'autres leur prise en charge facilitée. Il faut néanmoins insister sur l'importance fondamentale d'un traitement symptomatique bien conduit qui précède et accompagne les autres phases – si elles sont justifiées – du traitement en toxicologie : épuration du toxique et traitement antidotique.

Pour en savoir plus

- Lejonc J.-L., Elkharrat D., Lapandry C. *et al*. Épuration digestive lors des intoxications aiguës. *Réanim Urgences* 1993 ; 2 : 169-75.
- Ipecac syrup. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004 ; 42 : 133-43.
- Gastric lavage. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004 ; 42 : 933-43.
- Single-dose activated charcoal. *Clin Toxicol* 2005 ; 43 : 61-87.
- Cathartics. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004 ; 42 : 243-53.
- Whole bowel irrigation. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004 ; 42 : 843-54.
- Vale J. A., Krenzelok E. P., Barceloux G. D. Position statement and practice guidelines on the use of multi-dose activated charcoal in the treatement of acute poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999 ; 37 : 731-51.
- Proudfoot A. T., Krenzelok E. P., Vale J. A. Position Paper on urine alkalinization. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004 ; 42 : 1-26.
- Tournoud C., Nisse P., Garnier R., Labadie M., Ducluzeau R., Danel V. L'épuration digestive, rénale et extra rénale des toxiques. *JEUR* 2003 ; 16 : 95-101.
- Tournoud C., Nisse P., Saviuc P., Hantson P., Danel V. Antidotes aux urgences. *JEUR* 2006 ; 19 : 43-50.



Toxicologie clinique

Toxicologie de l'alcool méthylique

J.-M. WARNET, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, université Paris-V.

L'alcool méthylique ou méthanol (autres noms : carbinol, alcool de bois, esprit-de-bois), premier terme de la série des alcools, est un solvant qui présente un intérêt toxicologique constant, en raison de ses utilisations, de son mode d'action toxique et des moyens utilisés pour le combattre.

I. Propriétés physico-chimiques

Le *méthanol* est un liquide incolore, volatil, inflammable et d'odeur caractéristique.
- Formule : $H_3C - OH$.
- N° CAS : 67-56-1 ; n° CE : 603-001-007.
- Mr = 32,04 ; d = 0,79 ; E° = 64,5 °C ; dvap = 1,11.

Il est soluble dans l'eau, l'éthanol, l'éther, le benzène, les cétones, les hydrocarbures halogénés. C'est un bon solvant des colorants, graisses, résines, matières plastiques, ainsi que de nombreux sels inorganiques (NaI, $CaCl_2$, NH_4NO_3...). Le méthanol est dialysable.
Sa fonction alcool confère au méthanol deux propriétés chimiques importantes :
- d'une part, il est *estérifiable* par les acides organiques et inorganiques avec formation d'esters méthyliques qui peuvent présenter un intérêt analytique : le parabromobenzoate de méthyle est cristallisé, à la différence du p-bromobenzoate d'éthyle, qui est liquide,
- d'autre part, c'est un *réducteur* qui est oxydable sous l'action des oxydants usuels ($KMnO_4$ ou $K_2Cr_2O_7$ en milieu acide) en formaldéhyde puis en acide formique.

II. Étiologie des intoxications

Le méthanol peut être responsable d'intoxications dans deux circonstances principales :
- en milieu industriel, lors de son utilisation comme agent de synthèse (formaldéhyde, esters méthyliques) et comme solvant et agent d'extraction. Les intoxications aiguës ou, surtout, chroniques sont alors consécutives à l'inhalation de vapeurs de méthanol, plus rarement au contact avec les téguments ;
- à la suite de l'ingestion, généralement accidentelle, de produits contenant du méthanol : alcool à brûler (alcool dénaturé par addition de méthylène-Régie contenant une forte proportion de méthanol et d'acétone) et alcool frelaté de contrebande (vin, pastis, etc.), source d'intoxications collectives plus particulièrement dans les temps de prohibition et de guerre.

En outre, sa présence éventuelle dans des carburants de substitution est susceptible de poser des problèmes sanitaires et environnementaux.

III. Toxicocinétique

A. Absorption

Le méthanol peut être absorbé par trois voies :

- digestive : après ingestion unique, la concentration sanguine atteint un pic en 30 à 60 minutes ;
- pulmonaire : le taux de rétention pulmonaire a été estimé à 58 % ;
- cutanée : le taux d'absorption a été estimé à 0,192 mg/cm²/min, soit comparable à celui du benzène, du xylène et du sulfure de carbone.

B. Diffusion

Le méthanol diffuse rapidement dans l'eau totale de l'organisme, son volume de diffusion étant de 0,6 L/kg de poids corporel. Sa demi-vie plasmatique est d'environ 24 heures. Au bout de quelques heures, la concentration de méthanol dans le liquide céphalorachidien est supérieure à celle dans le sang.

C. Biotransformation

Le méthanol subit un métabolisme oxydatif toxifiant, principalement au niveau du foie, le processus se développant en trois étapes :

- *1.**Oxydation du méthanol en formaldéhyde** sous l'action de l'alcool-déshydrogénase cytoplasmique à NAD, qui est relativement lente par rapport à celle de l'éthanol ; deux autres systèmes enzymatiques peuvent intervenir : le système microsomal des mono-oxygénases P450-dépendantes et le système catalase-peroxydase localisé dans les peroxysomes.*
- *2.**Oxydation rapide du formaldéhyde en acide formique** sous l'action de la formaldéhyde-déshydrogénase cytoplasmique utilisant le glutathion, avec formation intermédiaire de S-formylglutathion, et de l'aldéhyde-déshydrogénase mitochrondriale à NAD. Le système catalase-peroxydase pourrait jouer un rôle ; les formiates retrouvés dans le sang sont en partie excrétés dans les urines.*
- *3.**Oxydation de l'acide formique en anhydride carbonique**, après fixation du radical formyle sur l'acide tétrahydrofolique sous l'action de la 10-formyltétrahydrofolate-synthétase puis intervention de la 10-formyltétrahydrofolate-déshydrogénase au niveau du cytoplasme ; expérimentalement, le déficit en tétrahydrofolate diminue la dégradation des formiates et la production de CO_2 alors que l'addition de méthionine les augmente. Le système catalase-peroxydase peut également intervenir.*

D. Élimination

Le méthanol peut être éliminé sous forme inchangée dans les urines (3 à 10 %) ou dans l'air expiré (10 à 30 %).
Les formiates s'accumulent dans l'organisme en raison de la lenteur de leur dégradation. Ils sont excrétés dans les urines.

Le dioxyde de carbone est éliminé par voie pulmonaire.
L'élimination du méthanol est beaucoup moins rapide que celle de l'éthanol.

IV. Toxicité

Le méthanol est toxique par lui-même, exerçant un effet anesthésique membranaire, et par ses métabolites : le formaldéhyde, inhibiteur enzymatique formant des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines enzymatiques, et surtout l'acide formique, inhibiteur des enzymes ferrugineuses dont la cytochrome-oxydase. Ces deux métabolites seraient responsables du découplage de la phosphorylation oxydative entraînant le blocage énergétique des processus métaboliques avec formation de radicaux acides organiques dans l'organisme expliquant en partie l'acidose métabolique observée dans les intoxications aiguës au méthanol.
C'est surtout l'accumulation de formiates qui est responsable de l'atteinte oculaire : expérimentalement, le taux de formiates est identique dans le sang et le liquide céphalorachidien, et les formiates peuvent traverser les vaisseaux choroïdes et s'accumuler dans la tête du nerf optique ; l'inhibition expérimentale de la cytochrome-oxydase par les formiates permet d'expliquer la démyélinisation et la formation de l'œdème papillaire par blocage du flux axoplasmique.
Il en résulte que, sur le plan thérapeutique, il est possible d'intervenir à deux niveaux du métabolisme du méthanol afin d'éviter l'accumulation des métabolites toxiques :
- blocage de la première étape (oxydation du méthanol en formaldéhyde),
- stimulation du catabolisme des formiates.

Il est à noter que le méthanol est nettement moins toxique chez les rongeurs que chez les primates du fait d'une réserve hépatique élevée de tétrahydrofolate qui favorise la transformation rapide du formiate en CO_2.
De plus, la lenteur de l'élimination du méthanol en fait un toxique *cumulatif* pouvant entraîner des intoxications à plus ou moins long terme.
La dose mortelle par ingestion est très variable : 7 à 250 mL par suite d'une grande différence de sensibilité individuelle.
Sur le plan des expositions professionnelles, la valeur limite d'exposition à court terme (VLE) est de 1 000 ppm, soit 1 300 mg/m^3, et la valeur limite de moyenne d'exposition (VME) est de 200 ppm, soit 260 mg/m^3.

V. Symptomatologie

Le méthanol peut être responsable d'intoxications aiguës et d'intoxications à plus ou moins long terme (« chronique »). Par rapport à l'intoxication à l'alcool éthylique, les symptômes d'intoxication méthylique aiguë sont plus tardifs, plus graves et durent plus longtemps tandis que les intoxications chroniques sont plus rapides.

A. Intoxications aiguës

Schématiquement, elles se déroulent en trois phases.

1. Phase de latence

Sa durée est variable selon la voie d'absorption :
- 9 à 24 heures, voire plus courte (45 minutes) ou plus longue (48 à 72 heures), en cas d'ingestion ;
- quelques heures en cas d'inhalation avec ou sans absorption percutanée ;
- 7 heures (1 à 13 heures) après application cutanée.

Elle est plus longue (90 heures) en cas d'ingestion concomitante d'éthanol.

2. Phase de début

Sont surtout observés des troubles neuro-digestifs : ivresse classique (ébriété et modifications de l'humeur : euphorie, irritabilité) mais douloureuse et pénible avec céphalée, vertiges, étourdissements, malaise général, nausées, vomissements et, surtout après ingestion, douleurs abdominales intenses.

3. Phase d'état

Elle est marquée par :
- des phénomènes nerveux : agitation et fureur comateuse, contractions musculaires intenses ; c'est l'ivresse méchante ; parfois des convulsions peuvent survenir chez l'enfant ou en phase terminale ; le coma s'installe ensuite ;
- une défaillance respiratoire ;
- une hypotension artérielle avec tachycardie, hypothermie et sueurs abondantes ;
- des troubles oculaires caractéristiques de cette intoxication : flou visuel, brumeux, blanchâtre ou grisâtre, baisse de l'acuité visuelle. L'évolution passe souvent par une amélioration précoce transitoire ; si la vision ne redevient pas normale après 6 jours de traitement, elle diminuera encore ultérieurement. Les signes visuels correspondent à la constitution d'une névrite optique (due à l'action de l'acide formique) dont la complication majeure est la cécité définitive. Il y a toujours une mydriase avec aréflexie totale, aidant au diagnostic chez le comateux. Le fond d'œil révèle l'œdème papillaire blanc plus ou moins nacré puis l'atrophie papillaire et l'irrégularité des bords artériels. Les formes atténuées rattachées à la névrite rétrobulbaire, avec fond d'œil normal, scotome central et dyschromatopsie centrale, rétrécissement du champ visuel, paraissent de meilleur pronostic ;
- des signes biologiques :
  - l'acidose métabolique est constante et sévère : le pH artériel peut être inférieur à 7, la pCO_2 à 25 torrs, les bicarbonates à 10 mmol/L ; le pH urinaire est acide (5,5 à 6) ; cette acidose métabolique est déterminante pour le pronostic ; de son importance et de sa durée dépendent en grande partie les pronostics oculaire et vital. Il y a, en outre, augmentation des « trous » anionique (> 20 mmol/L) et osmolaire (> 15 mOsm/kg H_2O) ;

– quelques signes rénaux assez fréquents : protéinurie, glycosurie, hématurie microscopique ;
– la glycémie est généralement élevée ;
– la lactacidémie est légèrement augmentée.

4. Évolution

La mort peut survenir à n'importe quel moment de l'intoxication par défaillance cardio-respiratoire.
Les séquelles oculaires sont redoutables, notamment la cécité totale ou partielle, et souvent irréversibles.
L'observation, en imagerie par résonance magnétique, d'une nécrose putaminale bilatérale associée à des lésions hémorragiques est un facteur de mauvais pronostic.
La guérison sans séquelles ne concerne que les intoxications bénignes et celles pour lesquelles l'intervention thérapeutique a été précoce.

B. Intoxications chroniques

En situation professionnelle, l'exposition chronique à des taux atmosphériques de méthanol avoisinant 200 ppm entraîne l'apparition de céphalées tenaces et récidivantes ; pour des concentrations de 1 200 à 1 800 ppm, ce sont les troubles visuels qui peuvent apparaître.
Le contact cutané répété avec du méthanol entraîne des signes d'irritation cutanée : dermite, érythème, desquamation.

VI. Traitement

Outre les premiers gestes, trois principes doivent prévaloir à la conduite du traitement : corriger l'acidose, bloquer la formation des métabolites toxiques ou en stimuler le catabolisme, et discuter l'hémodialyse. Enfin, on peut réaliser un traitement symptomatique d'appoint.

A. Les premiers gestes

Lors d'une intoxication aiguë par ingestion, l'épuration digestive s'impose si elle est précoce (dans les 2 heures suivant l'ingestion) : vomissements provoqués chez un sujet conscient en dehors des structures hospitalières, lavage gastrique à l'hôpital, après intubation en cas de troubles de la conscience. Le sirop d'ipéca est contre-indiqué (il potentialise la dépression du SNC et les convulsions), et le charbon actif est peu efficace (faible adsorption du méthanol).
Quand la voie de pénétration est pulmonaire et/ou cutanée, il faut bloquer toute absorption supplémentaire en sortant l'intoxiqué de l'atmosphère toxique et en lavant les téguments après déshabillage.

Les manœuvres de secourisme sont pratiquées en cas d'altération des fonctions vitales.

B. Principes de traitement

Trois principes prévalent à la conduite du traitement.

1. Correction de l'acidose métabolique

La correction de l'acidose métabolique est réalisée par apport rapide et énergique de solution alcalinisante ($NaHCO_3$ ou THAM), sous stricte surveillance tant clinique (risque d'œdème aigu du poumon surtout) que biologique (équilibres acido-basique et hydroélectrolytique, kaliémie notamment, vérifiés fréquemment), vu les quantités importantes souvent nécessaires.

2. Interventions sur le métabolisme du méthanol

a) Blocage de l'oxydation du méthanol en métabolites toxiques

Le blocage de l'oxydation du méthanol en métabolites toxiques : formaldéhyde et acide formique, est obtenu par un antidote agissant par compétition ; deux sont utilisables : l'éthanol et le 4-méthylpyrazole.

■ *Éthanol*

L'antidote le plus « naturel » est l'éthanol puisque le catabolisme de ces deux alcools utilise les mêmes systèmes enzymatiques qui ont une affinité plus grande pour l'éthanol :

- *in vitro*, le méthanol est oxydé 9 fois plus lentement que l'éthanol et son oxydation est bloquée s'il est dans un rapport de 1/16 avec l'éthanol ;
- *in vivo*, une éthanolémie de 0,46 g/L inhibe théoriquement 76 % du métabolisme du méthanol ; une éthanolémie de 1 g/L bloque complètement l'oxydation du méthanol.

L'éthanol est administré le plus précocement possible en quantité suffisante pour obtenir et maintenir un taux sanguin de 1 g/L permettant de saturer l'alcool-déshydrogénase.

En pratique, deux voies d'administration sont utilisables :

- la voie orale, si le sujet est conscient : 50 mL d'éthanol puis 10 mL/h ;
- la voie intraveineuse, si le sujet est comateux : 0,75 g/kg au début puis 0,50 g/kg toutes les 4 heures ou bien perfusion de 2 à 3 litres d'une solution d'éthanol à 5 %.

Il faut insister sur la nécessité de surveiller et de maintenir l'éthanolémie à 1 g/L tant qu'il existe du méthanol dans le sang ; la dose d'entretien peut varier selon que le sujet est abstinent (66 mg/kg/h) ou éthylique chronique (154 mg/kg/h) ; l'éthanol étant dialysable, ces doses seront majorées en fonction de son extraction au cours des hémodialyses.

■ *4-méthylpyrazole*

Le 4-méthylpyrazole, antidote compétitif agissant en inhibant l'alcool-déshydrogénase, présente l'avantage de ne pas risquer de provoquer une intoxication éthylique ; il est administré par voie veineuse (solution aqueuse de sulfate à 100 mg de base par flacon de 20 mL).
La dose de charge est de 15 mg/kg, injectée en 45 minutes, suivie d'une dose d'entretien de 10 mg/kg toutes les 12 heures jusqu'à disparition du méthanol du sang.
C'est la même spécialité que pour le traitement de l'intoxication à l'éthylène-glycol, mais qui a obtenu l'extension d'indication pour le méthanol en 2004.

b) Stimulation du catabolisme des formiates

Elle est obtenue par l'administration d'acide tétrahydrofolique (des doses de 50 mg en IV toutes les 4 heures pendant 24 heures ont été essayées, mais l'optimisation de ce traitement reste à faire).

3. Épuration du toxique et de ses métabolites

Dans tous les cas, l'indication d'épuration extrarénale (EER) doit être discutée et ne sera écartée qu'en cas de bénignité certaine évaluée à la fois sur les dosages de toxique et l'état clinique du patient. En principe :

- si le sujet est conscient, si le délai d'absorption est inférieur à 12 heures et si la méthanolémie est inférieure à 0,30 g/L : pas d'EER ; encore faut-il contrôler que les taux sanguins et urinaires de méthanol s'abaissent régulièrement sous les seules thérapeutiques alcalinisantes et alcoolisées ;
- un état comateux ou la présence de troubles oculaires, même avec une méthanolémie basse, justifient l'EER ; les taux d'acide formique, quand ils sont déterminés, sont en principe élevés ;
- en cas d'intoxication mixte éthanol-méthanol (alcool à brûler), l'indication d'EER est souvent délicate car la méthanolémie est souvent faible et l'absorption *concomitante* d'éthanol évite en général l'indication : on se contente alors d'un traitement symptomatique et de surveiller la régression des taux sanguins des deux alcools concernés.

L'épuration extrarénale va donc permettre de dialyser :

- le méthanol dont le catabolisme est bloqué ;
- ses métabolites toxiques, HCHO et HCOOH ;
- l'éthanol utilisé comme antidote ; il convient alors d'en augmenter la dose administrée pour maintenir l'éthanolémie souhaitable. Une dose supplémentaire d'éthanol de 7,2 g/h serait nécessaire pour une dialysance de l'éthanol de 120 mL/min chez un adulte de 70 kg.

La méthode la plus efficace est l'hémodialyse si l'on en juge par la comparaison de la clairance rénale du méthanol (1,3 à 5,9 mL/min) avec la dialysance de la dialyse péritonéale (17,5 à 24,6 mL/min) et de l'hémodialyse (90 à 200 mL/min).
Les critères d'indication de l'*hémodialyse* sont :

- une méthanolémie supérieure à 20 mmol/L (0,60 g/L),
- la présence d'une acidose métabolique sévère (déficit en bases > 15-20 mmol/L),

- l'existence de troubles visuels subjectifs ou objectifs en rapport avec une éventuelle intoxication par le méthanol,
- l'absorption de plus de 30 mL de méthanol, plus petite dose létale connue chez l'homme.

La dialyse péritonéale reste indiquée en l'absence de toute possibilité d'hémodialyse.

L'hémoperfusion est inefficace.

C. Traitement symptomatique

Il n'a rien de spécifique :
- l'hyperventilation assistée assure, outre la maîtrise de la fonction respiratoire, une élimination non négligeable du toxique ;
- la dose d'anticonvulsivants éventuellement nécessaire sera revue en fonction de l'alcoolisation qui en potentialise les effets.

VII. Prophylaxie

La prévention consiste en :
- l'utilisation de méthanol dénaturé impropre à l'ingestion ;
- en milieu industriel : la ventilation des locaux, le port de gants et de masques.

VIII. Diagnostic toxicologique

Il repose sur l'analyse des atmosphères en cas d'intoxications industrielles et sur l'analyse des milieux biologiques dans tous les cas d'intoxication.

A. Atmosphères

C'est essentiellement la recherche et le dosage du méthanol qui sont réalisés.

Détection avec le tube Draeger.

Captage de l'air à analyser par barbotage dans de l'eau distillée refroidie puis dosage par une méthode chimique (colorimétrie) ou physique (CPG) comme dans le cas du sang. Rappelons que les valeurs limites dans les ambiances de travail sont de 1 000 ppm (VLE) et 200 ppm (VME).

B. Milieux biologiques

Leur étude comprend :
- la recherche et le dosage du méthanol dans le sang et les urines ainsi que dans le liquide suspect ;

- la recherche et le dosage de l'acide formique dans le sang et les urines ;
- certaines analyses biologiques.

1. Dosage du méthanol

Deux grands groupes de méthodes sont utilisables : chimique et physique.

a) Méthodes chimiques

Elles comportent trois temps :
- isolement par distillation en présence d'acide picrique comme pour l'éthanol,
- oxydation spécifique du méthanol en formaldéhyde par le permanganate de potassium en milieu sulfurique,
- dosage du formaldéhyde par l'une des trois réactions très sensibles suivantes :
  - Schiff : fuchsine basique décolorée, en milieu sulfurique concentré (violet-rouge) ;
  - Eegriwe : acide chromotropique (acide 1,8-dihydroxynaphtalène-3,6-disulfonique) en milieu sulfurique concentré (rouge) ;
  - Schryver : phénylhydrazine et ferricyanure en milieu chlorhydrique rouge.

$$HCHO + H_2N-N(H)(C_6H_5) \longrightarrow H_2C=N-N(H)(C_6H_5) + H_2O$$

Phénylhydrazone

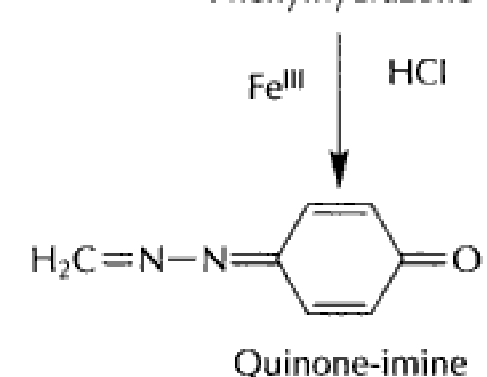


Figure 1.

Dans les trois cas, le dosage est terminé par une lecture spectrophotométrique.

b) Méthodes physiques : CPG

Elles comportent deux temps :
- isolement par distillation en présence d'acide picrique ou par déprotéinisation ou par espace de tête,
- dosage comme dans le cas de l'éthanol.

Leur avantage principal est de détecter simultanément le méthanol et l'éthanol.

2. Dosage de l'acide formique (pour mémoire)

L'augmentation de la formiatémie est retardée par rapport à celle de la méthanolémie. Elle peut être observée en cas d'intoxication par le formaldéhyde.

3. Analyses biologiques

Exploration de l'équilibre acido-basique.
Bilan hydroélectrolytique. Glycémie. Lactacidémie.
Analyse des urines.

4. Interprétation des résultats

Les différents dosages doivent être répétés pour permettre l'évaluation métabolique du toxique et la surveillance bioclinique.
Une méthanolémie élevée peut témoigner d'une intoxication sévère récente aussi bien que d'une intoxication moins importante mais couplée à la prise d'éthanol qui bloque son catabolisme ; dans les deux cas, la formiatémie est relativement basse.
Une méthanolémie relativement basse peut être observée au cours d'une prise toxique minime récente ou d'une intoxication grave mais ancienne ; le taux de formiatémie permet de trancher : bas dans le premier cas, élevé dans le second.
L'augmentation de la formiatémie semble corrélée avec le trou anionique, la réserve alcaline et l'excès de base.

L'essentiel de la question

L'alcool méthylique ou méthanol peut être responsable d'intoxications industrielles (agent de synthèse, solvant, agent d'extraction) et ménagères (alcool dénaturé, alcools frelatés). Le méthanol est biotransformé dans le foie par l'alcool-déshydrogénase en formaldéhyde qui est ensuite oxydé en acide formique ; ce sont les formiates qui sont responsables de la toxicité oculaire du méthanol. L'intoxication aiguë se manifeste, après un temps de latence de plusieurs heures, par des signes neurologiques, digestifs et visuels, ces derniers traduisant une névrite optique dont la complication majeure est la cécité ; parallèlement se développe une acidose métabolique sévère. En outre, le méthanol est un toxique cumulatif pouvant entraîner des intoxications professionnelles chroniques par voie respiratoire ou par contact cutané répété. Le traitement est basé sur la correction de l'acidose métabolique, le blocage de l'oxydation du méthanol par l'éthanol ou le 4-méthylpyrazole, et l'épuration extrarénale du toxique et de ses métabolites. La détermination de la méthanolémie permet de confirmer le diagnostic et de contrôler l'efficacité du traitement (ne pas oublier l'exploration des équilibres acido-basique et hydroélectrolytique ainsi que l'analyse des urines).

Pour en savoir plus

- Conso F., Mignee C. Monoalcools autres que l'alcool éthylique. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie – Pathologie professionnelle, 16-047-A-25, 1997 : 1-9.
- Coudore F., Lamaison D., Lavarenne J. Toxicologie du méthanol et de l'éthylène-glycol. *Lyon Pharm* 1997 ; 48 : 343-53.
- Jacobsen D., McMartin K. E. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *Clin Toxicol* 1997 ; 35 : 127-43.
- Kavet R., Nauss K. M. The toxicity of inhaled methanol vapors. *Crit Rev Toxicol* 1990 ; 21 : 21-50.
- Lapostolle F., Bismuth C., Baud F. Classification des antidotes : aspects pratiques (2e partie). *Sem Hop Paris* 1999 ; 75 : 108-14.

Toxicologie de l'éthylène-glycol

J.-M. WARNET, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, université Paris-V.

L'éthylène-glycol ou 1,2-éthanediol ou monoéthylène-glycol ou « glycol », premier terme de la série des glycols, est un solvant qui présente un intérêt toxicologique constant en raison de ses utilisations, de son mode d'action toxique et des moyens utilisés pour le combattre.

I. Propriétés physico-chimiques

L'éthylène-glycol est un liquide visqueux, incolore, inodore, de saveur chaude et sucrée, peu volatil et peu inflammable.

- Formule : $CH_2OH–CH_2OH$.
- N° CAS : 107-21-1 ; n° CE.E : 603-027-00-1.
- Mr = 62,07 ; d = 1,11 ; E° = 198 °C ; dvap = 2,14 (air = 1).

L'éthylène-glycol est soluble dans, et donc miscible avec, l'eau et la plupart des solvants organiques (alcool éthylique, acétone, acide acétique, glycérine, pyridine, aldéhydes). Il est peu soluble dans l'éther et insoluble dans les huiles, les graisses, les hydrocarbures halogénés.

Il est incompatible avec les agents oxydants puissants qui le transforment en produits d'oxydation à fonction aldéhyde et acide, puis en acides oxalique et formique. Il est incompatible avec les bases.

II. Étiologie des intoxications

L'éthylène-glycol est utilisé dans l'industrie comme fluide hydraulique, fluide calovecteur, intermédiaire de synthèse chimique et pour la fabrication d'explosifs, de condensateurs. Il entre dans la composition de peintures, laques, vernis, cirages, cosmétiques, adoucisseurs du linge.

Mais c'est surtout son utilisation comme *antigel* qui représente la principale source d'intoxications :

- soit volontaires, dans un but de suicide, surtout chez l'adulte ;
- soit accidentelles, survenant dans différentes circonstances :
  - confusion avec une boisson sucrée (enfants, adultes, animaux domestiques), favorisée par la dilution qui fait perdre à l'éthylène-glycol sa saveur chaude pour ne laisser subsister que celle sucrée, les quantités ingérées pouvant être alors importantes et exposer à un risque mortel ; ainsi les liquides de refroidissement pour moteur de voiture, présentés soit en bouteilles plastiques de type alimentaire, soit en containers, et dont le surplus est conservé par le consommateur dans des bouteilles vides d'eau minérale, peuvent-ils être confondus avec un sirop dilué. La prise de conscience tardive de l'erreur lors de la survenue des premiers symptômes est un facteur d'aggravation supplémentaire de cette circonstance accidentelle ;
  - ingestion de l'eau d'un chauffage central ou d'un chauffe-eau (absence de valve anti-retour) ;

– méconnaissance du risque : ingestion volontaire de l'« eau » d'un radiateur de voiture en cas de pénurie (voyageurs dans des zones désertiques).

Enfin, l'éthylène-glycol a défrayé la chronique en 1985 dans l'affaire des vins autrichiens, mais son addition et/ou celle de diéthylène-glycol a été, au plus, de 3 g/L et ne semble pas avoir eu de conséquences toxiques.

III. Toxicocinétique

La voie de pénétration de l'éthylène-glycol est essentiellement digestive, les voies respiratoire et percutanée ne jouant qu'un rôle très secondaire.

A. Absorption

L'éthylène-glycol est rapidement absorbé (en moins de 2 heures) par l'estomac et tout le tractus digestif.

B. Distribution

L'éthylène-glycol diffuse rapidement dans l'eau totale de l'organisme, son volume de distribution étant de 0,7 à 0,8 L/kg de poids corporel. Sa demi-vie plasmatique est de 3 à 6 heures.

C. Biotransformation

L'éthylène-glycol (EG) subit un métabolisme oxydatif toxifiant, principalement au niveau du foie et des reins, l'oxydation portant alternativement et/ou simultanément sur ses deux fonctions alcool :

1) *Oxydation de l'éthylène-glycol en aldéhyde glycolique* sous l'action de l'alcool-déshydrogénase (ADH) cytoplasmique à NAD, qui est relativement lente par rapport à celle de l'éthanol.
2) *Oxydation de l'aldéhyde glycolique en acide glycolique* sous l'action de l'aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) ; l'aldéhyde glycolique peut aussi subir une oxydation de sa fonction alcool et conduire à un dialdéhyde, le glyoxal.
3) *Oxydation de l'acide glycolique en acide glyoxylique* sous l'action de la lactate-déshydrogénase (LDH). Le glyoxal peut être oxydé également en acide glyoxylique par l'ALDH.
4) *Oxydation de l'acide glyoxylique en acide oxalique* sous l'action de la LDH, l'acide oxalique pouvant précipiter sous forme de cristaux de sel de calcium dans les cellules tubulaires rénales notamment. L'acide glyoxylique peut être également transformé rapidement suivant d'autres voies métaboliques :
   – transamination pyridoxine-dépendante conduisant à la glycine qui, en présence d'acide benzoïque présent dans certaines préparations d'antigels, donne de l'acide hippurique ;

- condensation en acide α-hydroxy, β-cétoadipique en présence de pyrophosphate de thiamine et de magnésium ;
- condensation en oxalomalate et en α-hydroxy γ-cétoglutarate ; ces trois derniers produits de condensation bloquent le cycle de Krebs et augmentent ainsi la production d'acide lactique déjà couplée avec la régénération du NAD de l'ADH ;
- décarboxylation oxydante en formiate qui sera oxydé en anhydride carbonique (*cf. méthanol*).

Les différentes voies métaboliques assurant la transformation de l'éthylène-glycol sont représentées dans le schéma suivant :

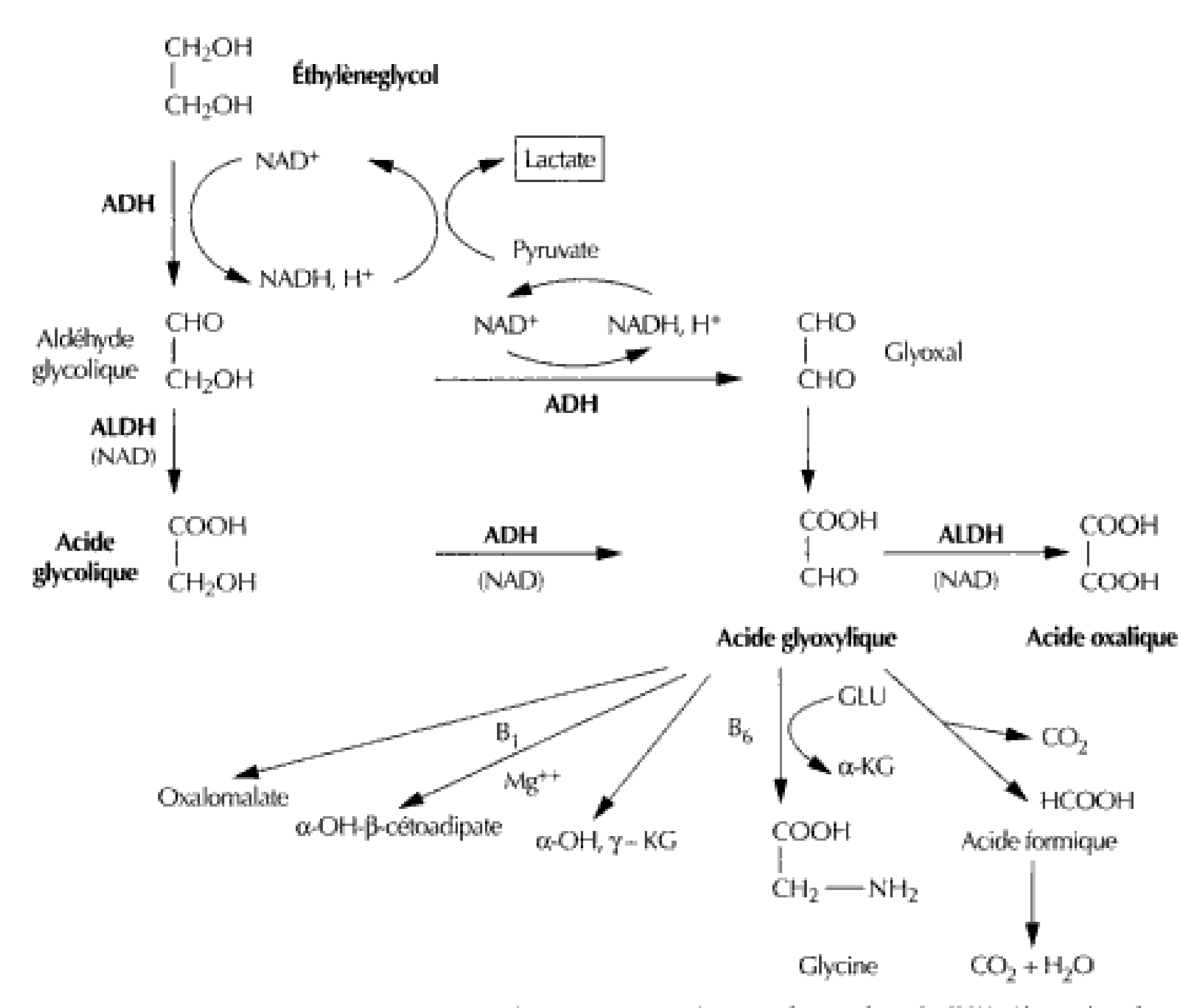


Figure 1. Les différentes voies métaboliques assurant la transformation de l'éthylène-glycol

D. Élimination

L'éthylène-glycol inchangé est éliminé dans les urines pendant quelques heures.
L'acide glycolique est retrouvé dans les urines sous forme de sels (jusqu'à 34 à 44 % de la dose administrée). Ni l'aldéhyde glycolique, ni l'acide glyoxylique n'ont été retrouvés dans les urines.
L'acide oxalique correspond à environ 2,3 % de la dose d'éthylène-glycol ingérée chez l'homme.

IV. Toxicité

L'éthylène-glycol est toxique par lui-même, entraînant une excitation puis une dépression du système nerveux central, et, surtout, par ses métabolites :

- ceux à fonction aldéhyde (aldéhyde glycolique, glyoxal, acide glyoxylique) inhibent la phosphorylation oxydative, le métabolisme du glucose (glycolyse et cycle de Krebs : principaux producteurs d'ATP), la synthèse des protéines, la réplication de l'ADN et l'ARN ribosomal ; ils réagissent avec les fonctions thiols, groupe actif de nombreuses enzymes ; ce sont eux qui seraient responsables des signes centraux de l'intoxication survenant entre la 6e et la 12e heure après l'ingestion ; en effet, ils dépriment les centres respiratoires, le métabolisme de la sérotonine et altèrent les taux d'amines cérébrales ;
- les acides glycolique, glyoxylique, formique et lactique, qui contribuent, le premier surtout, à l'acidose métabolique importante ;
- l'acide oxalique forme des cristaux d'oxalate de calcium soit monohydratés (en forme d'aiguilles), soit dihydratés (en forme d'enveloppes), qui se déposent dans la plupart des tissus et en particulier les reins, le cerveau, le myocarde, les yeux, le pancréas ; la néphropathie organique aiguë généralement attribuée à cette précipitation cristalline peut, cependant, survenir dans certains cas avec peu, voire sans dépôt de cristaux ; la formation d'oxalate de calcium est sans doute responsable de l'hypocalcémie observée dans les intoxications aiguës.

Il en résulte que, sur le plan thérapeutique, il importe de bloquer l'oxydation de l'éthylène-glycol afin d'éviter l'accumulation de métabolites toxiques.
La dose létale moyenne par ingestion est de 1 mL/kg chez l'enfant et de 1,4 mL/kg chez l'adulte, soit 100 mL pour un sujet de 70 kg. L'homme apparaît comme l'espèce la plus sensible, puis viennent le chat, le rat mâle, le lapin, la souris, le cobaye et le chien, les différences de toxicité entre les espèces animales étant en rapport avec leur aptitude à métaboliser l'éthylène-glycol.
Sur le plan des expositions professionnelles, la valeur limite d'exposition à court terme (VLE) est de 50 ppm, soit 125 mg/m^3, ce qui correspond à la valeur plafond américaine.

V. Symptomatologie

L'éthylène-glycol peut être responsable d'intoxications aiguës et, beaucoup plus rarement, d'intoxications « chroniques ».

A. Intoxications aiguës

Classiquement, leur symptomatologie passe par trois phases dont la durée et l'évolution dépendent en grande partie de la quantité absorbée ; leur traduction clinique correspondrait aux différentes phases métaboliques.

1. Première phase

Elle débute après une latence de 30 minutes à 4 heures et dure jusqu'à la 12ᵉ heure suivant l'ingestion. Sont observés des troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales) et, surtout, des signes neurologiques : syndrome ébrieux avec agitation, troubles du comportement, dysarthrie, dysphasie, puis somnolence et coma hypotonique ; sont souvent notés un nystagmus et des convulsions. L'EEG est évocateur d'un œdème cérébral (anomalies paroxystiques généralisées ou focalisées sur fond d'ondes lentes) confirmé par l'examen du fond d'œil, révélant un flou des bords papillaires et une congestion veineuse, et par l'examen du LCR, dont la pression est augmentée, et qui montre une discrète pléiocytose (200 éléments/mm^3) et une hyperprotéinorachie. Cette atteinte neurologique centrale semble due à l'éthylène-glycol lui-même et aux aldéhydes dont le pic plasmatique est atteint 6 à 12 heures après l'ingestion.
À ce stade, le bilan biologique sanguin révèle une hyperglycémie, une hyperleucocytose (1 000 à 40 000 éléments/mm^3) en rapport avec un hyperadrénergisme, une hypocalcémie modérée, et montre, surtout, une hyperosmolalité et une acidose métabolique constante et sévère qui est un élément fondamental du diagnostic ; le « trou » anionique est important.

2. Deuxième phase

Elle s'étend jusqu'à la 24ᵉ heure après l'ingestion et est marquée par des signes cardiovasculaires habituellement bénins : tachycardie, hypotension modérée, mais qui peuvent, dans les formes graves, consister en des troubles de la conduction et de l'excitabilité cardiaque, voire une insuffisance circulatoire aiguë, traduisant une myocardite toxique. La défaillance cardiaque peut se compliquer d'un œdème pulmonaire pouvant entraîner la mort entre la 24ᵉ et la 72ᵉ heure. Des lésions de myosite, avec parfois inclusions de cristaux d'oxalate de calcium dans le myocarde, ont été découvertes lors d'examens anatomopathologiques.

3. Troisième phase

Elle est dominée par l'atteinte rénale, qui n'apparaît qu'entre la 24ᵉ et la 72ᵉ heure. Il s'agit d'une tubulopathie aiguë généralement anurique, avec de vives lombalgies, oligurie, protéinurie, glycosurie, hématurie microscopique, pyurie, cylindrurie, abondants cristaux d'oxalate de calcium, cristaux d'acide hippurique, hyperazotémie (urée, créatinine).
L'évolution de l'insuffisance rénale est imprévisible : régression complète, anurie persistante au bout de 4 mois, parfois évoluant vers l'insuffisance rénale chronique. Des complications visuelles (mydriase aréflexique, œdème papillaire et altérations dégénératives rétiniennes) peuvent survenir. L'amaurose est rare et pourrait être due à l'acide formique formé.

4. Évolution

Le pronostic est fonction de la profondeur du coma, de l'importance et de la durée de l'acidose, de l'intensité de l'oxalurie et du moment de l'intervention thérapeutique.

Les intoxications aiguës sont souvent mortelles en raison du diagnostic tardif et du retard apporté au traitement :
- état de mal convulsif ;
- décomposition cardio-pulmonaire avec acidose sévère ;
- fausses routes, syndrome de détresse respiratoire aiguë ;
- insuffisance rénale aiguë.

La guérison sans séquelle est possible quand le traitement est précoce, même après l'ingestion d'une très grande quantité de toxique (2 litres). Sinon, il risque de subsister des séquelles neurologiques, probablement liées à l'œdème cérébral du début puis aux dépôts d'oxalate dans le cerveau : syndrome pyramidal et extrapyramidal, instabilité ; vertiges, déséquilibre, régression intellectuelle importante.

B. Intoxications chroniques

L'exposition répétée aux vapeurs d'éthylène-glycol est responsable d'une irritation des muqueuses oculaires et respiratoires ; un nystagmus, une somnolence et une hyperleucocytose ont également été rapportés.
L'éthylène-glycol franchit la barrière placentaire ; il est fœtotoxique et tératogène (os, SNC) chez le rat et la souris.
Il est à noter que la présence d'inhibiteurs de corrosion dans les antigels du commerce peut entraîner la formation de N-nitrosodiéthanolamine cancérogène.

VI. Traitement

Sa précocité conditionne en grande partie le pronostic.
Le traitement doit donc être mis en route sans retard et s'attacher à empêcher la formation de métabolites toxiques précocement, donc avant même que le diagnostic positif n'ait été formellement établi, d'où l'importance de la connaissance de l'anamnèse : interrogatoire précis de la victime (si son état de conscience le permet) et des témoins éventuels, et recherche des récipients ayant pu contenir le produit ingéré pour identification organoleptique et analyse.
Outre les premiers gestes, trois principes doivent prévaloir à la conduite du traitement : corriger l'acidose, bloquer la formation des métabolites toxiques, épurer le toxique et discuter l'hémodialyse d'emblée.

A. Premiers gestes

Lors d'une intoxication aiguë par ingestion, l'épuration digestive s'impose :
- vomissements provoqués sur place, le plus précocement possible ;
- lavage d'estomac, après intubation trachéale en cas de troubles de la conscience ; le charbon activé a un faible pouvoir adsorbant vis-à-vis de l'éthylène-glycol.

En cas de projection oculaire : lavage au soluté salin physiologique ou à l'eau ; si la solution est concentrée, consultation d'un ophtalmologue.

B. Correction de l'acidose

Apport massif et rapide de solution de bicarbonate de sodium à 30 % en perfusion IV, qui facilite théoriquement la formation d'oxalate de sodium qui s'élimine mieux que l'oxalate de calcium. Il faut penser à corriger une éventuelle hypocalcémie. Le tout doit être réalisé sous stricte surveillance autant clinique que biologique.

C. Blocage de l'oxydation de l'éthylène-glycol en métabolites toxiques

Il est obtenu par un antidote agissant par compétition. Deux sont utilisables : l'éthanol et le 4-méthylpyrazole.

1. Éthanol

Il agit en saturant l'ADH, ce qui entraîne un allongement de la demi-vie de l'éthylène-glycol (17 heures). L'alcoolisation est à mettre en œuvre le plus tôt possible, avant les résultats des dosages et dès la connaissance de l'anamnèse ; il faut ensuite adapter le traitement en fonction des résultats de l'alcoolémie dont le taux à maintenir autour de 1 g/l (22 mmol/l) :

a) Dose de charge : éthanol à 95°, 1 mL/kg

- Elle est administrée :
- soit *per os*, dilué au tiers dans une boisson sucrée (faire boire ou administrer par la sonde gastrique) ;
- soit IV, dilué dans un soluté (glucose).

Il faut surveiller régulièrement le taux d'éthanol dans le sang.

b) Dose d'entretien : éthanol à 95°, 0,1 à 0,3 mL/kg

Elle doit être adaptée au sujet : le métabolisme hépatique de l'éthanol varie entre 75 et 175 mg/kg/h, soit :
- 0,1 mL pour les non-buveurs,
- 0,2 mL pour les buveurs occasionnels,
- 0,3 mL pour les alcooliques.

Pendant l'hémodialyse, il faut doubler les doses d'entretien ou ajouter 7 200 mg d'éthanol/heure, soit 11 mL d'alcool à 95°.

L'alcoolisation implique une surveillance attentive de la glycémie chez l'enfant.

Il faut noter que l'inhibition partielle de l'ADH peut permettre la transformation de l'éthylène-glycol en acide oxalique par l'intermédiaire du glyoxal (« shunt métabolique »).

2. 4-méthylpyrazole

Cet inhibiteur compétitif de l'ADH entraîne un allongement de la demi-vie plasmatique de l'éthylène-glycol, qui passe à 10-16 heures. Cet antidote a été développé par l'ex-Pharmacie centrale des hôpitaux et est sur le marché depuis 1999 sous forme de solution aqueuse de sulfate à 100 mg de base par ampoule de 20 mL

(Fomépizole AP-HP)[1]. Il est administré par voie IV lente après dilution d'une ampoule dans du NaCl ou du glucose isotonique, à la dose de charge de 15 mg/kg, puis à doses dégressives d'entretien, toutes les 12 heures (10, 7,5 et 5 mg/h) en fonction du taux d'éthylène-glycol circulant. Ce médicament est réservé à l'usage hospitalier et à l'usage en situation d'urgence ; son utilisation apparaît plus simple et plus sûre que l'alcoolisation.

D. Épuration du toxique et de ses métabolites

Elle peut être réalisée en favorisant la diurèse (solutés IV de mannitol, glucose et/ou bicarbonate, ou diurétiques éventuellement) tout en évitant toute surcharge liquidienne par une surveillance biochimique stricte, et, surtout, en ayant recours à l'hémodialyse (ou à la dialyse péritonéale) qui permet d'épurer l'éthylène-glycol, l'ensemble de ses métabolites et de corriger rapidement l'acidose. L'hémodialyse est réservée aux intoxications massives et sévères. Son indication est basée sur :
- un taux d'éthylène-glycol sanguin ≥ 0,50 g/L ;
- et, même en l'absence de taux sanguin, l'anamnèse et l'existence d'une acidose métabolique sévère.

Elle est impérative au stade oligo-anurique.
En pratique, sauf cas de bénignité certaine, l'indication de l'hémodialyse doit être précoce car, théoriquement, l'introduction d'éthanol doit intervenir avant la 6e heure pour prévenir toute toxicité ; or le médecin est souvent confronté à un patient dont la symptomatologie installée signe un stade suffisamment avancé dans le métabolisme pour nécessiter la prévention des complications rénales et neurologiques.
L'hémoperfusion est inefficace.

E. Traitement symptomatique

En cas de convulsions, injecter une benzodiazépine (diazépam ou clonazépam) ou un barbiturique.
En cas de défaillance respiratoire : intubation, ventilation assistée et, si nécessaire, administration de médicaments vasopresseurs (dopamine et/ou dobutamine).

VII. Prophylaxie

Veiller au conditionnement correct des antigels ou autres formulations contenant de l'éthylène-glycol.
En cas d'épandage, éviter la contamination des eaux de boisson (surface et nappe phréatique) en adsorbant l'éthylène-glycol avec du sable ou de la vermiculite, entreposer dans des containers, bien ventiler la zone et laver à grande eau quand

1. Cette spécialité a valu le prix Galien 2001 à Frédéric Baud, Dominique Pradeau et Alain Astier.

le ramassage du produit adsorbé est complet. Les secouristes devront porter lunettes, gants, chaussures et vêtements évitant le contact avec la peau et les yeux, utiliser un masque en cas d'aérosol ou de vapeur (chaleur).
Il faut signaler que les affections engendrées par l'éthylène-glycol sont incluses dans les tableaux des maladies professionnelles n° 84 du régime général et n° 48 du régime agricole consacrés aux solvants organiques liquides à usage professionnel.
Les produits prêts à l'emploi ou concentrés sur le marché doivent contenir un agent répulsif comme le benzoate de dénatonium (décret n° 95-326 du 20 mars 1995, *JO* du 25 mars 1995).

VIII. Diagnostic toxicologique

Il repose sur la mise en évidence et le dosage de l'éthylène-glycol et sur certaines analyses biologiques (sang et urines).

A. Mise en évidence et dosage de l'éthylène-glycol

Ils peuvent être faits :
- dans un échantillon du produit supposé avoir été ingéré ou dans des récipients (verre, bouteille),
- sur un prélèvement de liquide gastrique,
- sur le sang, les urines.

Les méthodes peuvent être utilisées en méthodes d'orientation et en méthodes diagnostiques.

1. Méthodes d'orientation

Elles ont été proposées pour faciliter le diagnostic en urgence et faire appel à un équipement disponible dans tous les laboratoires (pour la première) ; leur intérêt réel reste à démontrer :
- méthode enzymatique à l'ADH en tampon Tris : elle permet de doser des concentrations d'éthylène-glycol de 0,20 à 1,50 g/L ; l'interférence du méthanol et de l'éthanol peut être supprimée par chauffage de 30 minutes à 100 °C ;
- utilisation de l'interférence de l'éthylène-glycol dans le dosage enzymatique des triglycérides, en prétraitant le sérum avec de la lipase, de la glycérolkinase et d'autres cofacteurs utilisés pour doser les triglycérides qui sont ainsi éliminés de même que le glycérol ;
- utilisation de trousses-réactifs (« kits ») permettant le dosage de l'éthylène-glycol après oxydation périodique en formaldéhyde qui est dosé par une méthode colorimétrique.

2. Méthodes diagnostiques

Elles sont disponibles surtout dans les laboratoires spécialisés de toxicologie analytique :

- chromatographie en phase gazeuse (CPG) : il existe de nombreuses méthodes nécessitant toutes une détection par ionisation de flamme. Les méthodes à injection directe sont peu sensibles et difficilement reproductibles. La CPG des dérivés boronates est actuellement la meilleure méthode ;
- chromatographie liquide haute performance, sous forme de benzoyl-esters ;
- l'isotachophorèse et la spectrométrie de masse sont des méthodes de recherche.

B. Analyses biologiques

Elles sont d'autant plus indispensables que peu de services cliniques peuvent disposer des résultats de dosage de l'éthylène-glycol en moins de 24 heures, or le diagnostic positif est une **urgence**.
L'éthylène-glycol peut avoir disparu du sang circulant lorsque l'intoxiqué, même comateux, arrive tard à l'hôpital.
Trois types d'examen peuvent orienter le diagnostic :

- l'exploration de l'équilibre acido-basique, avec la découverte d'une acidose métabolique sévère ;
- le bilan hydroélectrolytique permettant de mettre en évidence un « trou » anionique et un « trou » osmolaire importants ;
- l'examen du culot urinaire révélant la présence de cristaux d'oxalate de calcium en « enveloppe ».

C. Interprétation des résultats

Lors d'intoxications aiguës, les taux d'éthylène-glycol sanguin peuvent atteindre plusieurs grammes par litre (jusqu'à 7 g/L).
Il faut noter la possibilité de rebonds (augmentation des taux sanguins d'éthylène-glycol) à l'arrêt de l'hémodialyse.
L'existence concomitante d'une acidose métabolique sévère, d'un « trou » anionique et d'un « trou » osmolaire ≥ 30 mOsm/kg H_2O est en faveur d'une intoxication par l'éthylène-glycol et/ou le méthanol, en l'absence d'éthanol (une alcoolémie à 0,70 g/L correspond à $700 \div 46 \approx 15$ mOsm/L).
Enfin, la présence de cristaux d'oxalate de calcium dans le sédiment urinaire peut renforcer la suspicion d'intoxication par l'éthylène-glycol, mais ces cristaux ne sont pas toujours présents, même en cas d'intoxication aiguë.
En conclusion, l'intoxication par l'éthylène-glycol est une intoxication grave qui nécessite la conjonction de l'analyse toxicologique et de la biologie pour en réaliser le diagnostic et préciser l'évolution. En outre, l'efficacité d'un antidote, le 4-méthylpyrazole, remet en cause le recours à l'alcoolisation et l'indication systématique de l'hémodialyse dans le traitement de l'intoxication par l'éthylène-glycol.

L'essentiel de la question

L'éthylène-glycol est le constituant principal des antigels dont l'absorption constitue la principale cause d'intoxication. L'éthylène-glycol subit une oxydation successive de ses deux fonctions alcool conduisant à des métabolites aldéhydiques, inhibiteurs enzymatiques, et acides (glycolique et oxalique notamment). L'intoxication aiguë se manifeste après un temps de latence de quelques heures par des signes digestifs et neurologiques, avec développement d'une acidose métabolique, puis cardiovasculaires, voire pulmonaires, et enfin rénaux : tubulopathie aiguë. Le traitement est basé sur le blocage de l'oxydation de l'éthylène-glycol par l'éthanol ou le 4-méthylpyrazole, la correction de l'acidose métabolique et l'hémodialyse. Le dosage de l'éthylène-glycol dans le sang permet de confirmer le diagnostic et de contrôler l'efficacité du traitement (ne pas oublier l'exploration des équilibres acido-basique et hydroélectrolytique ainsi que l'examen du culot urinaire).

Pour en savoir plus

- Coudore F., Lamaison D., Lavarenne J. Toxicologie du méthanol et de l'éthylène-glycol. *Lyon Pharm* 1997 ; 48 : 343-53.
- INRS. Ethylèneglycol, Fiche toxicologique n° 25, 1997.
- Jacobsen D., McMartin K.E. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *Clin Toxicol* 1997 ; 35 : 127-43.
- Jouglard J., Arditti A., Brun A., David J.-M., Jean P. Glycols. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Intoxications – Pathologie du travail, 16047 D10, 4-1990 : 1-12.
- Lapostolle F., Bismuth C., Baud F. Classification des antidotes : aspects pratiques (2e partie). *Sem Hôp Paris* 1999 ; 75 : 108-14.

Toxicologie de l'éthanol

D. ERNOUF, UFR des sciences pharmaceutiques, Tours.
A. PINEAU, UFR des sciences pharmaceutiques, Nantes.

L'éthanol ou alcool éthylique, communément appelé « alcool », est un produit largement diffusé. L'alcool résulte de la fermentation alcoolique des sucres et se retrouve ainsi dans les boissons. En France, la consommation moyenne par habitant et par an est de 9,4 litres d'alcool pur. Cette consommation entraîne une intoxication aiguë (ivresse) ou une intoxication à long terme, véritable toxicomanie (alcoolisme). Le risque toxique est trop souvent ignoré ou banalisé. L'éthanol ne correspond pas à l'image empirique d'un toxique : il est largement diffusé, la consommation de faibles quantités inférieures à la dose-seuil ne présente pas de risque et même, au contraire, peut présenter un intérêt ; enfin, l'intoxiqué prétend vivre normalement sans tenir compte des signes de son intoxication qui diminuent ses aptitudes sensorielles ou motrices responsables d'accident (du travail, de circulation, domestique).

La consommation d'éthanol est très ancienne puisque, six mille ans avant Jésus-Christ on trouve la culture de la vigne et l'apparition du vin fermenté. On se limite à la consommation de boissons fermentées jusqu'à la découverte, au XIVe siècle, de la distillation, qui permet d'obtenir « l'eau-forte » ou une « eau-de-vie ».

Le degré alcoométrique centésimal ou degré alcoolique correspond au pourcentage volumétrique d'alcool pur d'un mélange liquide :

$$n \text{ degrés} = 100 \times \frac{\text{volume d'alcool pur}}{\text{volume total du liquide}}.$$

Ainsi, un litre de vin à 12 degrés contient 12 % par volume d'éthanol, soit dans un litre :

$$\frac{12 \times 1\,000 \text{ mL}}{100} = 120 \text{ mL ou } 120 \times 0{,}789 = 94{,}68 \text{ g d'éthanol pur.}$$

La dimension des verres destinés à recevoir des boissons alcoolisées est standardisée et calculée de manière à apporter environ 10 g d'alcool par verre.

On distingue cinq classes d'alcools :

- *les boissons fermentées :*
  - *vin : 10° à 16°,*
  - *cidre : 2° à 7°,*
  - *bière : 2° à 10° ;*
- *les boissons distillées : 40° à 70° ;*
- *les boissons avec mélange de fermenté et distillé : 16° à 23° ;*
- *les boissons aromatisées : 30° à 50° ;*
- *les liqueurs : 15° à 65°.*

I. Source. Propriétés physico-chimiques

L'éthanol ou alcool éthylique (CH_3CH_2OH), numéro de CAS 64-17-5, est un liquide mobile, incolore, volatil (tension de vapeur : 5,85 kPa à 20 °C et 53,3 kPa à 63,5 °C ; facilement inflammable), d'odeur plutôt agréable avec un seuil de détection olfactive voisin de 200 ppm (valeur moyenne d'exposition ou VME de 1 000 ppm ou 1 900 mg/m^3).

L'éthanol est miscible à l'eau avec dégagement de chaleur et contraction du volume. Il est également miscible aux alcools, à l'éther éthylique et à de nombreux

solvants organiques. C'est un bon solvant des graisses et de nombreuses matières plastiques.
Masse molaire : 46,07 ; densité : D420 = 0,789 ; densité de vapeur : 1,59 ; point de fusion : – 114 °C ; point d'ébullition à pression atmosphérique : 78,5 °C (pour l'azéotrope à 4,4 % d'eau : 78,2 °C).
En France, l'alcool dénaturé correspond le plus souvent à de l'éthanol modifié par 3 à 5 % de solvants (dont une part importante de méthanol).
L'éthanol est dialysable. Il absorbe dans l'infrarouge vers 3,4 µm (liaison C–H) et vers 9,4 µm (liaison –OH).

II. Cinétique

A. Résorption

La voie digestive constitue la principale voie de contact puis de pénétration de l'éthanol dans l'organisme humain. La résorption à travers la muqueuse digestive s'effectue par simple diffusion, pour partie au niveau de l'estomac, en majorité (70 %) et rapidement dans l'intestin grêle. La résorption est influencée par la vacuité de l'estomac, par les associations éventuelles (elle est ralentie par les anticholinergiques, les amphétamines…) et par la nature de la boisson consommée. Ainsi la résorption est-elle plus rapide à jeun (pic plasmatique atteint en moins d'une heure), pour des boissons titrant entre 10° et 30°, en l'absence de fructose, de graisses, de protéines, de boisson gazeuse ou de facteurs retardant la vidange gastrique. La consommation d'une quantité massive en une fois entraîne une alcoolémie plus élevée que la même quantité répartie en doses fractionnées. Le pic de concentration sanguine est atteint en 30 à 90 minutes.
La voie transcutanée peut être impliquée chez les jeunes enfants (compresses alcoolisées). La rétention pulmonaire est de 62 % et constitue en milieu professionnel (chais, caves…) une voie d'imprégnation.
La voie parentérale est rarement utilisée.

B. Distribution

Compte tenu de sa petite taille et de son hydrosolubilité, l'éthanol diffuse rapidement dans les tissus très vascularisés (cerveau, poumons, foie). La concentration dans le LCR est supérieure à la concentration dans le sang. La concentration dans le liquide amniotique et chez le fœtus est proche de l'alcoolémie de la mère. Les graisses fixent peu l'éthanol ce qui explique la différence de distribution entre les individus en fonction de la masse graisseuse. Le coefficient de répartition r moyen est de 0,7 (0,62 à 0,79) chez l'homme et de 0,6 (0,55 à 0,66) chez la femme. Il est plus élevé chez l'enfant.

C. Élimination

Environ 5 à 10 % de l'éthanol est éliminé sans dégradation soit par voie urinaire (2 à 3 %), soit par la sueur (1 %), soit par la salive, les larmes, le lait ou par la voie pulmonaire.
La quantité éliminée par la voie pulmonaire augmente en fonction de la ventilation du sujet et peut représenter de 1 % (sujet sédentaire) à 10 % (effort physique) de la quantité présente dans l'organisme. La présence d'éthanol dans l'air expiré justifie l'emploi de ce milieu dans la recherche (éthylotest) ou le dosage (éthylomètre) de l'éthanol chez un sujet. En moyenne, on considère que 2 100 mL d'air contiennent autant d'éthanol que 1 mL de sang. Cependant il faut noter de grandes variations individuelles de 1 000 à 3 400.
Le rapport alcoolurie/alcoolémie est en moyenne de 1,30.

D. Métabolisme

La principale voie de désimprégnation est la voie métabolique oxydative, qui concerne 90 à 95 % de la quantité d'éthanol présente dans l'organisme. Ce métabolisme est majoritairement hépatique, cependant de 5 à 15 % a lieu dans l'estomac, l'intestin ou le rein. Le métabolisme oxydatif stomacal de l'éthanol correspond à un « effet de premier passage ».
Le métabolisme oxydatif comporte la transformation successive de l'éthanol en acétaldéhyde puis en acétate jusqu'au stade de dioxyde de carbone et d'eau.

1. Formation de l'acétaldéhyde

a) Alcool déshydrogénase

La voie principale de transformation physiologique de l'éthanol en acétaldéhyde implique l'alcool déshydrogénase (ADH) cytosolique suivant la *figure 1* :

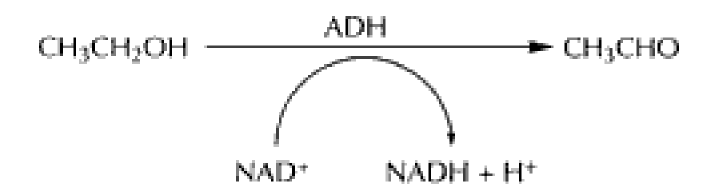


Figure 1. Oxydation de l'éthanol : action de l'alcool déshydrogénase

L'ADH est une métalloenzyme dimérique à quatre atomes de Zn, NAD-dépendante. Cette voie fonctionne quel que soit le niveau d'alcoolémie. La vitesse d'oxydation de l'éthanol dépend de la disponibilité du NAD. Il existe différentes isoenzymes réparties en six classes et codées par huit gènes (de ADH1 à ADH8). La classe I (ADH1 à ADH3) est caractérisée par des enzymes à Km bas et Vmax élevée. L'ADH2 est la forme la plus active mais également la plus sensible à l'action inhibitrice du pyrazole par formation d'un complexe ADH-pyrazole-NAD. L'ADH est une enzyme non spécifique de l'éthanol qui métabolise d'autres alcools (méthanol, propanol, butanol, rétinol...). Elle participe à l'oxydation d'alcools secondaires en

cétone, à l'oxydation des acides gras et à la déshydrogénation des stéroïdes. L'inhibition de cette enzyme est mise à profit dans le traitement des intoxications par le méthanol ou l'éthylène glycol.
La classe III (ADH5) est surtout impliquée dans l'oxydation des alcools à longue chaîne. Enfin, la classe IV (ADH7) code pour l'enzyme à localisation gastrique. Cette dernière, moins active chez la femme, expliquerait en partie sa plus grande sensibilité face à l'éthanol. L'ADH n'est pas inductible.
L'augmentation du rapport NADH/NAD est importante sur le plan biologique. Elle est responsable de l'augmentation de l'acide lactique (acidose et hyperuricémie), de l'alpha-glycérophosphate (augmentation de la synthèse des triglycérides) et des acides gras (par diminution de leur oxydation). Il entraîne une diminution de la néoglucogenèse (responsable de l'hypoglycémie).

b) La voie du MEOS

Une seconde voie concerne l'oxydation microsomale de l'éthanol. Elle est inductible, non spécifique et ne peut métaboliser qu'une fraction de l'éthanol. Elle n'intervient qu'en cas de concentration importante. Il s'agit de la voie du MEOS (*microsomal ethanol oxidizing system*) découverte par Lieber et Decarli en 1968. Elle se situe au niveau du réticulum endoplasmique, principalement des hépatocytes de la région centrolobulaire. Son affinité pour l'éthanol est faible. La réaction fait intervenir, comme cofacteur du NADPH, de l'oxygène moléculaire et une NADPH cytochrome P450 oxydoréductase (CYP2E1). On obtient de l'acétaldéhyde, du NADP+, des formes réactives de l'oxygène (radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$) et un radical 1-hydroxyéthyle ($CH_3\,^{\bullet}CHOH$) suivant la *figure 2*.

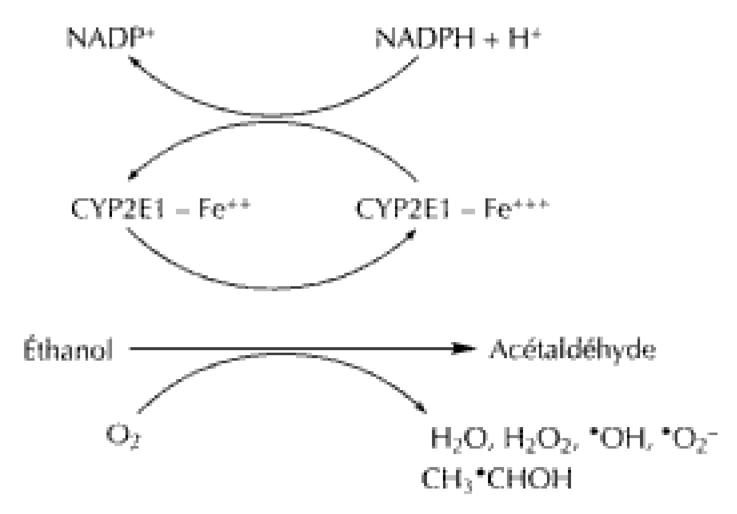


Figure 2. Oxydation de l'éthanol : voie du MEOS

Cette transformation toxifiante, par la formation de radicaux libres, entraîne une lipoperoxydation, responsable d'une partie de la toxicité hépatique de l'éthanol. Les inhibiteurs du CYP2E1, tel l'isoniazide, diminuent l'hépatotoxicité de l'éthanol.
Ce système de métabolisation est non spécifique car il métabolise d'autres substrats (CCl_4, paracétamol, vitamine A, halothane, corticoïdes, nitrosamines…). Il est inductible par l'éthanol, le jeûne ou la consommation de repas hyperlipidiques.

Ces particularités métaboliques expliquent les interférences complexes entre l'alcool, les médicaments (*cf. infra*) ou les xénobiotiques industriels.

c) Catalase

La troisième voie oxydative implique la catalase, hémoprotéine localisée dans les peroxysomes. Cette voie, limitée par la vitesse de formation de l'un des substrats, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), demeure accessoire, sauf chez les éthyliques chroniques. On peut schématiser la réaction suivant la *figure 3* :

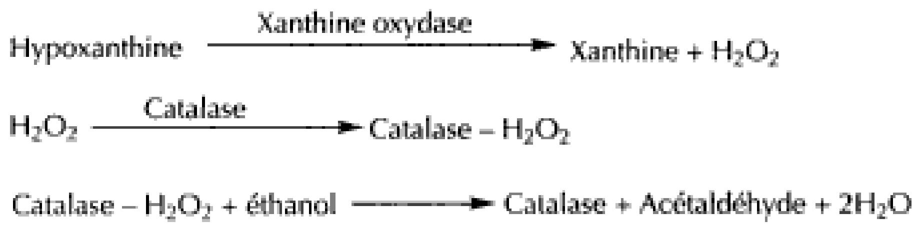


Figure 3. Oxydation de l'éthanol : voie de la catalase

Comme le précédent, ce système est inductible par l'éthanol, le jeûne et l'alimentation hyperlipidique. Il est non spécifique de l'éthanol. Les voies de biotransformation de l'éthanol sont saturables. La décroissance de l'alcoolémie varie linéairement avec le temps et est proche de 0,15 g/L/h (variations individuelles).

2. Oxydation de l'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde peut être considéré comme le métabolite toxique de l'éthanol. Il est responsable des désagréments observés lors de la consommation importante d'éthanol (nausées, vomissements, céphalées, asthénies).
L'oxydation de plus de 90 % d'acétaldéhyde en acétate correspond à une réaction de détoxication. Elle est réalisée par une aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) non spécifique de l'éthanol qui peut également cataboliser le formaldéhyde, le glycéraldéhyde, les amines biogènes ou les aldéhydes issus de la dégradation des membranes cellulaires par peroxydation. L'ALDH est une enzyme hépatique NAD-dépendante dont il existe au moins quatre isoenzymes ALDH1,3,4 à localisation cytosolique et ALDH2 mitochondriale. Cette dernière présente une Vmax élevée et est prépondérante chez les éthyliques. Chez le sujet normal, l'acétaldéhyde est rapidement oxydé en acétate. Cependant l'ALDH1 peut être inhibée par le tétraéthylthiuram ou disulfirame utilisé dans le maintien de l'abstinence (effet Antabuse) entraînant une accumulation d'acétaldéhyde. Le même effet peut être observé avec les dérivés nitrés, certains sulfamides hypoglycémiants, la cyanamide, le nitrofurane… à l'origine d'interaction Antabuse éthanol-xénobiotiques (*cf. infra*). Une faible activité de l'ALDH2 (due à l'allèle ALDH2-2) entraîne le même effet et correspond au syndrome de « flushing » fréquemment observé chez les Orientaux (« oriental flush »). Sur le plan clinique, ce « flushing » correspond à une congestion faciale, une tachycardie, des brûlures digestives…

3. Oxydation de l'acétate

L'acétate est surtout véhiculé en dehors du foie (75 %) où il subit un catabolisme oxydatif en acétyl CoA puis en dioxyde de carbone et en eau. La fraction qui reste

dans le foie au niveau cytosolique va être oxydée par une thiokinase, en présence d'ATP et de CoA réduit, en acétyl CoA qui intégrera le cycle tricarboxylique avec dégradation en dioxyde de carbone et en eau.

4. Métabolisme non oxydatif

Bien que le métabolisme de l'éthanol soit majoritairement oxydatif, il existe également des transformations non oxydatives telles que la formation d'esters éthyliques d'acides gras (SNC et cœur) ou la synthèse de phosphatidyléthanol dans les membranes cellulaires (SNC).

5. Bilan et conséquences des transformations métaboliques

a) Bilan

Le catabolisme oxydatif de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase puis par l'aldéhyde déshydrogénase conduit à l'acétate qui, secondairement par l'intermédiaire de l'acétyl CoA, donne du CO_2 et de l'H_2O. La dégradation peut s'écrire ainsi :

$$CH_3CH_2OH + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O + 7{,}1 \text{ kcal/g}$$

Parallèlement à cette oxydation, on a réduction de NAD en NADH. La régénération du NAD peut s'effectuer dans le cytosol, sous l'action d'une lacticodéshydrogénase qui va transformer le pyruvate en lactate. Ce dernier, en passant dans le sang, entraîne une hyperlactacidémie qui limite l'élimination d'acide urique et favorise la goutte, fréquente après consommation d'éthanol. Le NAD peut également être régénéré par la chaîne respiratoire ou la chaîne d'oxydoréduction phosphorylante mitochondriale. Comme la membrane mitochondriale est imperméable aux cofacteurs pyridiniques (NAD et NADH), l'oxydation du NADH cytosolique implique l'intervention du système malate-oxaloacétate-aspartate avec réduction du NAD mitochondrial en NADH. Dans la mitochondrie, la formation excessive de NADH est associée à une carence en NAD mitochondriale. Ce dernier est indispensable à la β-oxydation des acides gras. Sa carence, fréquente en cas d'éthylisme, explique la perturbation du catabolisme des acides gras et la stéatose hépatique associée.

b) Conséquences

L'éthanol, qui fournit 7,1 kcal/g, a un rendement énergétique qui se situe entre celui des glucides (4 kcal/g) et des lipides (9 kcal/g). Cependant, l'éthanol ne peut être assimilé à un nutriment. En effet, l'énergie fournie ne peut couvrir que 50 % du métabolisme basal (700 à 800 kcal/j), ce qui correspond à l'utilisation d'environ 100 g d'éthanol par jour. De plus, l'énergie fournie n'est pas utilisable pour l'effort musculaire et/ou la lutte contre le froid ; au cours du travail musculaire ou au cours de la thermorégulation avec exposition au froid, on n'observe pas d'augmentation de l'oxydation de l'éthanol. La sensation de réchauffement associée à la consommation d'éthanol résulte d'une vasodilatation cutanée. La sensation stimulante dépend d'un effet sur le SNC.

Enfin, l'oxydation métabolique de l'éthanol permet d'éliminer de 0,1 à 0,2 g/kg/h d'éthanol.

III. Mécanisme d'action toxique

L'éthanol est distribué dans tout l'organisme. Il passe très facilement toutes les membranes cellulaires. Le passage rapide et facile de l'éthanol à travers la barrière hémato-encéphalique est responsable des troubles neurologiques retrouvés lors des alcoolisations aiguës ou chroniques.

A. Alcoolisation aiguë

1. Au niveau du système nerveux central (SNC)

L'alcool, contrairement à beaucoup d'autres substances psychoactives, n'a pas de récepteur au niveau du SNC. Cependant, lors d'une prise aiguë ou subaiguë, l'alcool modifie certains systèmes de neurotransmission centrale. Le plus touché est le système GABAergique. L'alcool facilite le flux transmembranaire des ions chlorures modulé par les récepteurs $GABA_A$ au niveau des synaptosomes. Cette action semble être induite par une augmentation du couplage fonctionnel entre le récepteur GABA et le canal chlore et non par une interaction directe au niveau du récepteur. Ainsi l'alcool (comme les benzodiazépines, BZD), agissant comme agoniste GABAergique, est un dépresseur du SNC. Pour des concentrations cérébrales « modérées », la dépression centrale se fait initialement au niveau des systèmes inhibiteurs puis perd cette spécificité lorsque l'alcoolémie augmente. En prise aiguë, l'alcool modifie d'autres systèmes de neurotransmissions en agissant au niveau des couches lipidiques des membranes neuronales qu'il fluidifie. Cette variation des propriétés physiques de la membrane perturbe son fonctionnement tant au niveau de ses récepteurs qu'à celui des flux transmembranaires. Une alcoolisation aiguë stimule la transmission dopaminergique (donc le système de récompense cérébrale) ainsi que les transmissions noradrénergique et sérotoninergique. Il est reconnu que la sécrétion des opioïdes cérébraux endogènes (endorphines, enképhalines) est favorisée par l'alcool, ce qui participe à l'expression de ses effets gratifiants. Enfin, l'alcool est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques (aux aminoacides excitateurs) de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et se montre encore ainsi dépresseur du SNC.

2. Au niveau périphérique

En prise aiguë ou subaiguë, l'alcool possède un certain nombre d'autres activités pharmacologiques ou toxiques : vasodilatation périphérique, effet diurétique par réduction de la libération de l'hormone antidiurétique et de la résorption tubulaire de l'eau, effet myorelaxant sur les muscles squelettiques et l'utérus, irritation des muqueuses pour les fortes concentrations digestives et augmentation de la sécrétion gastrique acide. La traduction de ces activités est généralement peu marquée sauf au niveau des interactions médicamenteuses, avec les principes actifs possédant également l'un de ces effets (*cf. infra*).

B. Alcoolisation chronique

1. Au niveau du SNC

Il est maintenant admis au niveau du SNC que tous les sujets ne sont pas « égaux » devant l'alcool, notamment en ce qui concerne sa consommation répétée. Certains dysfonctionnements neurobiologiques, par exemple les états anxieux ou dépressifs, peuvent être initialement compensés par la prise d'alcool avec remise à niveau des systèmes déficients. L'alcool, comme d'autres produits addictifs, exerce alors des propriétés de « renforcement » négatif qui soulage les effets aversifs initiaux existants. Dans d'autres cas, l'alcool exerce un « renforcement » positif, hédonique par stimulation du système de récompense cérébrale, *via* les voies dopaminergiques méso-limbocorticales. Chez certains sujets « à risque », la consommation d'alcool pourrait emballer ce phénomène, rendant presque inévitable la répétition de l'alcoolisation. Lors de l'alcoolisation chronique, l'alcool induit des phénomènes d'adaptation qui s'opposent à ceux qu'il crée initialement. Cette régulation homéostatique est due en partie à une rigidification des membranes neuronales et à des mécanismes de rétrocontrôles adaptatifs. Ainsi les neurotransmissions GABAergique, sérotoninergique, noradrénergique, dopaminergique vont-elles peu à peu devenir déficientes malgré (mais à cause) des stimulations itératives de l'alcool. Au niveau des récepteurs NMDA, la neurotransmission induite par les aminoacides excitateurs est augmentée par un phénomène d'« up-regulation ». Toutes ces modifications vont à terme, en plus des phénomènes de dépendance, provoquer des troubles neurologiques d'intensité et de traduction variées. La tolérance à l'alcool, indépendamment de son métabolisme, est due à ces phénomènes de contre-régulation neurobiologiques qui, pour obtenir un même effet, imposent une consommation progressivement accrue.

2. Au niveau périphérique

Consommé de façon chronique, l'alcool exerce ses effets délétères sur d'autres organes.

Au niveau du foie, la stéatose, l'hépatite et la fibrose ont pour origine un défaut d'oxydation des acides gras avec accumulation de triglycérides, un excès de production de NADH et de radicaux libres associé à une diminution des moyens de défense (glutathion, vitamines), une nécrose puis une fibrinogenèse.

Au niveau du tube digestif, il y a une irritation chronique des voies digestives supérieures et de l'œsophage (potentialisée par le tabagisme), des gastrites, des ulcérations gastroduodénales et un dysfonctionnement des villosités intestinales, source de malabsorption.

Au niveau du pancréas, l'alcoolisme chronique est fréquemment responsable de pancréatites, aiguë ou chronique, qui seraient dues au métabolisme de l'éthanol *in situ* (acétaldéhyde, radicaux libres). L'évolution se fait à terme vers des calcifications pancréatiques et une insuffisance organique.

Au niveau de l'appareil cardiovasculaire, l'alcool (et/ou l'acétaldéhyde) est source de myocardiopathie avec dilatation des cavités cardiaques partiellement réversible après le sevrage. Une fibrose interstitielle peut s'installer progressivement. L'activation du système sympathique et du système rénine-angiotensine serait en partie

responsable de l'hypertension artérielle fréquemment retrouvée chez l'alcoolique chronique. Il est maintenant admis qu'une consommation régulière mais modérée d'alcool (environ 10 à 20 g/j soit 1 à 2 verres) possède un rôle protecteur sur la mortalité cardiovasculaire. Cette particularité, décrite dans le « paradoxe français », est due à l'augmentation des fractions HDL2 et surtout HDL3 du cholestérol, à une réduction de l'agrégabilité plaquettaire et du fibrinogène. La présence d'antioxydants polyphénoliques du vin rouge (type resvératrol) pourrait également inhiber la peroxydation lipidique et limiter la genèse de l'athérome. Il ne faut cependant pas oublier que la consommation excessive d'alcool peut être responsable d'hypertriglycéridémies très marquées (type IV avec augmentation des VLDL). Le risque cardiovasculaire qui décrit une courbe en U, en fonction de la quantité d'alcool bu, augmente très rapidement lorsque celle-ci dépasse 20 g/j.
Au niveau des systèmes endocriniens, l'alcool intervient de façon variée. Il n'a pas de propriétés virilisantes mais modifie chez l'homme la sécrétion d'hormone lutéinisante (LH), de testostérone et la spermatogenèse par l'intermédiaire de son métabolisme testiculaire. Chez la femme, la diminution de la sécrétion de LH, induite par l'alcool, peut entraîner une dysovulation et des aménorrhées. L'axe hypothalamo-hypophysaire est globalement peu touché, c'est-à-dire sans traduction symptomatologique notable, même si les sécrétions de prolactine, d'hormone thyréotrope, des hormones corticosurrénaliennes sont diminuées.
Au niveau du système hématopoïétique, les trois lignées peuvent être atteintes par la prise chronique d'alcool. Intervenant directement au niveau de la membrane de l'érythroblaste, il provoque une macrocytose qui peut s'accompagner d'anémie (mégaloblastique) si une carence en folate existe. La thrombopénie, classiquement présente chez l'alcoolique, est due à une diminution de synthèse médullaire et à une dégradation thrombocytaire accrue par hypersplénisme. La production leucocytaire est également diminuée, les leucocytes formés ayant une diminution de leur activité.

C. Sevrage

Au moment du sevrage, la physiopathologie de la symptomatologie est essentiellement due à une (mauvaise) réadaptation rapide des systèmes de neurotransmission. L'arrêt de la stimulation par l'alcool va brutalement lever les régulations qu'il induisait dès que l'alcoolémie sera proche de zéro. Ainsi seront démasqués un déficit de la transmission GABAergique, une hyperactivité glutamatergique et noradrénergique responsable de la plus grande partie de la symptomatologie physique du sevrage. Les autres déficits (sérotoninergique, dopaminergique, opioïdes endogènes) interviennent surtout au niveau psychique et dans le conditionnement à une nouvelle consommation.

D. Interactions alcool/médicaments

Les interactions entre l'alcool et les médicaments (IAM) sont nombreuses et variées, avec souvent des effets inverses lors de l'alcoolisation aiguë ou chronique et du degré d'insuffisance hépatique. Les IAM sont de natures pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

1. Interactions pharmacocinétiques

a) Au niveau de la résorption digestive

Une faible concentration alcoolique stomacale favorise l'évacuation gastrique alors qu'une forte concentration provoque un spasme pylorique. Les résorptions gastrique ou intestinale des médicaments sont donc modifiées. L'alcool augmente la solubilité et l'absorption de nombreux médicaments liposolubles (BZD, méprobamate...). L'irritation digestive que provoquent de fortes quantités d'alcool, surtout à jeun, favorise le passage de principes actifs (antibiotiques et antiparasitaires intestinaux) normalement peu ou pas résorbés.

b) Au niveau de la distribution

L'alcoolisation aiguë augmente le flux sanguin hépatique, donc l'effet de premier passage hépatique, des médicaments à forte extraction (bêtabloquants, tricycliques, benzodiazépines, paracétamol...). L'alcoolisation chronique en présence d'une anastomose porto-cave a une action inverse. En cas d'hypoalbuminémie, la fraction libre des médicaments liés à cette protéine est augmentée. La présence d'un important liquide d'ascite, plus ou moins riche en protéines, augmente le volume de distribution des médicaments.

c) Au niveau de la biotransformation

C'est à ce niveau que sont retrouvées les IAM les plus nombreuses et les plus variées. En prise aiguë, l'alcool peut intervenir comme inhibiteur compétitif du métabolisme de nombreux médicaments à biotransformations surtout oxydatives. Ces IAM interviennent soit au niveau des enzymes (ADH : digitaliques, éthambutol, floctafénine..., ou cytochrome P450 : phénobarbital, phénytoïne, paracétamol, BZD...), soit au niveau de leurs cofacteurs enzymatiques (antivitamines K, BZD). L'inhibition des cytochromes P450 peut avoir des conséquences favorables dans l'intoxication aiguë au paracétamol puisqu'elle va limiter la formation de son métabolite hépatotoxique. La prise chronique d'alcool a des effets différents et même souvent opposés à ceux de la consommation aiguë. L'éthanol intervient alors comme un inducteur enzymatique notamment au niveau des cytochromes P450. La biotransformation de nombreux médicaments est alors augmentée (antiépileptiques, BZD, sulfamides hypoglycémiants, antidépresseurs tricycliques...). L'effet thérapeutique sera alors diminué, sauf si les métabolites sont plus actifs que les principes actifs initiaux. De même, la toxicité de certains médicaments pourra être augmentée (paracétamol). L'alcoolisation aiguë sur fond de chronicité limitera la traduction cinétique de l'induction si les enzymes induites sont communes au métabolisme de l'éthanol et du médicament.
Après le sevrage alcoolique, les enzymes induites retrouvent assez rapidement leur activité initiale.
À un stade très avancé de la maladie alcoolique, l'insuffisance hépatocellulaire réduit la biotransformation médicamenteuse. Elle est souvent associée à une hypoalbuminémie qui augmente la forme non liée des médicaments.
Sur le plan cinétique, il existe aussi des interactions médicaments/alcool (IMA), où ce sont les médicaments qui agissent sur le devenir de l'éthanol. Ces IMA sont moins nombreuses et moins importantes que les IAM. Il ne sera évoqué ici que

l'inhibition de l'aldéhyde déshydrogénase par certains principes actifs responsables d'un effet Antabuse. Cet effet (céphalées, tachycardie, hyper- puis hypotension, sensation de chaleur intense, rougissement du visage, nausées, sueurs, vertiges) est classiquement décrit comme résultant de l'augmentation de l'acétaldéhydémie suite à l'inhibition de l'enzyme oxydant l'acétaldéhyde. Si le disulfirame est logiquement utilisé dans cet objectif, d'autres médicaments peuvent déclencher l'effet Antabuse et doivent donc faire l'objet d'une précaution d'emploi chez le consommateur d'alcool. Parmi eux, citons les imidazolés (métronidazole, kétoconazole), certaines céphalosporines, certains sulfamides hypoglycémiants, la procarbazine. Ces médicaments peuvent également provoquer un effet Antabuse avec la consommation de formes liquides médicamenteuses contenant des quantités non négligeables d'alcool comme vecteur de dissolution. L'effet Antabuse est également observé avec des produits chimiques (diméthylformamide, diéthylthiocarbamates, disulfure de carbone, cyanamide...) et avec un champignon (*Coprinus atramentarius* ou coprin noir d'encre).

2. Interactions pharmacodynamiques

Pour ces IAM, les modifications d'activités ou d'effets secondaires des médicaments se font sans modification de la concentration de ceux-ci au niveau de l'organe effecteur. Il s'agit le plus souvent d'une augmentation des effets pharmacologiques ou indésirables du médicament lorsque ceux-ci sont proches d'un de ceux de l'éthanol. Ce dernier possède un certain nombre d'activités pharmacologiques (*cf. supra*). Les IAM d'ordre pharmacodynamique ne concernent que les états d'alcoolisation aiguë et sont directement liées à l'importance de l'alcoolémie. Les IAM les plus marquées sont retrouvées avec les principes actifs également dépresseurs du SNC : psychotropes (dont les BZD), opiacés, antihistaminiques H_1. Ces IAM dynamiques peuvent être amplifiées par des interactions cinétiques. Avec les antihypertenseurs centraux (clonidine, alphaméthyldopa) et les vasodilatateurs nitrés, les alcoolémies « élevées » feront craindre un risque de collapsus. L'action de certains diurétiques, notamment les thiazidiques, est augmentée par l'alcool. Cela peut favoriser le passage rénal de médicaments (ou métabolites actifs) éliminés par cette voie.

Les interactions pharmacologiques entre l'alcool et les médicaments sont donc extrêmement nombreuses et variées. Elles sont dominées par un effet biphasique et l'alcool qui, en prise aiguë, a tendance à augmenter les effets des médicaments par actions cinétiques et/ou dynamiques et à les diminuer par action cinétique lors de l'alcoolisation chronique. Au cours de celle-ci, l'insuffisance hépatocellulaire (et l'hypoprotidémie) ou un sevrage effectif vont pouvoir ajouter de nouveaux volets cinétiques. La prescription et la délivrance médicamenteuse devront donc être très raisonnées chez le buveur d'alcool, même si beaucoup d'IAM présentes sur le plan fondamental n'ont pas (ou peu) de traduction thérapeutique. Ce sont les médicaments à marge thérapeutique étroite et à fort métabolisme hépatique, ainsi que ceux ayant un mécanisme d'action voisin de ceux de l'éthanol qui doivent retenir l'attention.

E. Alcool et autres substances psychoactives

L'éthanol interagit beaucoup avec les substances psychoactives illicites, notamment lorsqu'il est consommé conjointement en aigu (alcool « défonce ») avec elles. Certaines similitudes neurochimiques de ces consommations font que l'alcool va potentialiser les effets de renforcement positif (d'où « l'intérêt » de ce type d'associations). L'éthanol augmente aussi la fréquence et la gravité des effets délétères engendrés par les produits illicites (cannabis, ecstasy et autres amphétaminiques, poppers, cocaïne, héroïne).
Devant une conduite polyaddictive, la recherche d'une intoxication éthylique devra être effectuée.
L'éthanol est souvent utilisé en « automédication » comme un véritable produit de « substitution » d'autres substances psychoactives, notamment le cannabis et l'héroïne. Dans ce cas, l'alcool est souvent associé aux BZD, à la méthadone, la buprénorphine ou la codéine.

IV. Symptomatologie

A. Intoxication aiguë (ivresse alcoolique)

Pour un même sujet, il existe une assez bonne corrélation entre les signes observés et l'importance de l'alcoolémie. En revanche, à alcoolémies (ou consommations alcooliques) égales, tous les sujets n'auront pas la même symptomatologie. « Bien tenir l'alcool » n'est pas un signe de bonne santé, mais une manifestation d'une consommation chronique source de tolérance métabolique (induction enzymatique) et de tolérance neurochimique. Les valeurs d'alcoolémies reportées ici ne sont donc que des ordres de grandeur, les variabilités individuelles pouvant être importantes. L'ivresse typique se déroule en trois phases :

- Une phase d'excitation psychomotrice simple (alcoolémie $\geq 0,5$ g/L), qui correspond à la désinhibition centrale avec libération des tendances instinctives. Le sujet est habituellement euphorique, logorrhéique avec une tendance aux confidences. L'adaptation aux réalités extérieures, le sens du jugement, le temps de réaction, la volonté sont perturbés de façon variable. Une grande partie de ces signes est souvent recherchée, plus ou moins consciemment, au niveau de la convivialité dans les réunions où l'alcool est consommé. Parfois, des variations de l'humeur peuvent faire passer le sujet de la gaieté à la tristesse ou à l'agressivité.
- Une phase d'incoordination et d'instabilité (alcoolémie > 1 g/L), qui correspond à la dépression centrale. L'intoxiqué est ataxique, souvent somnolent, hébété, avec une désorientation spatio-temporelle. Le dysfonctionnement cérébelleux est à l'origine de la démarche ébrieuse et de troubles de l'équilibre. Ceux-ci sont également en accord avec un syndrome vestibulaire qui peut s'accompagner de nausées et de vomissements. Une diplopie et une mydriase bilatérale (initialement peu marquée) sont souvent présentes. La vasodilatation périphérique

colore les téguments et fait ressentir à l'intoxiqué une sensation de chaleur. L'alcool cependant « ne réchauffe pas » mais, au contraire, augmente ainsi la déperdition calorique.

- La phase de coma (alcoolémie > 3 g/L), qui correspond à une dépression profonde du SNC, sans signe de localisation. Le coma peut être un coma profond, le plus souvent calme, hypotonique avec abolition des réflexes ostéotendineux et de la sensibilité. La respiration est stertoreuse avec encombrement alvéolo-bronchique et hypoventilation. Une hypotension artérielle doit faire redouter un collapsus cardiovasculaire qui viendra aggraver l'anoxie et la dépression centrale. À ce stade, on observe fréquemment un relâchement des sphincters. La durée de ce coma est variable, liée à l'importance de l'alcoolémie, à la tolérance du malade et à ses capacités métaboliques. Devant un tel tableau clinique, surtout si l'alcoolémie ne paraît pas « très élevée », il est prudent, en fonction de l'anamnèse de l'intoxication, de penser à la prise concomitante de médicaments dépresseurs du SNC surtout, bien sûr, les BZD, très souvent associées à l'alcool dans les tentatives d'autolyse médicamenteuse. Le coma éthylique peut évoluer vers la mort de l'intoxiqué par dépression extrême des centres bulbaires respiratoires (et cardiaques) si l'alcoolémie est supérieure à 4 ou 5 g/L. Les troubles neurologiques de l'intoxication éthylique aiguë peuvent être source d'amnésies lacunaires qui efface de la mémoire du malade les faits vécus pendant l'intoxication.

Des ivresses atypiques peuvent se rencontrer chez certains sujets, notamment ceux ayant des antécédents psychiatriques. Ces ivresses peuvent être excitomotrices avec agressivité et épisodes maniaques brutaux, hallucinatoires avec bouffées oniriques et désordres visuels et auditifs, délirantes souvent liées à des thèmes de persécution.

B. Intoxication chronique

L'alcool étant une substance toxicomanogène, la plupart des consommateurs excessifs chroniques sont dépendants. La dépendance ne concerne cependant que les sujets qui ont perdu la liberté de s'abstenir de consommer de l'alcool. Elle peut être présente chez des consommateurs « modérés » mais réguliers d'alcool qui ne peuvent cependant pas arrêter leurs consommations. Bien qu'il soit difficile de fixer une limite définissant l'abus d'alcool, sont généralement considérés comme buveurs excessifs un homme consommant quotidiennement plus de 30 g d'alcool pur (3 verres) ou une femme en consommant plus de 20 g (2 verres).
En cas d'intoxication chronique, l'éthylisme se manifeste au niveau de différents organes.

1. Système nerveux

C'est au niveau du SNC qu'est retrouvée la triade : dépendance, tolérance, sevrage. La symptomatologie centrale est diverse, liée directement à l'alcool et/ou aux carences vitaminiques B de l'alcoolique souvent dénutri. L'atrophie cérébrale se traduit par des troubles psychiques et mnésiques et peut s'accompagner d'une atrophie cérébelleuse avec troubles de l'équilibre et de la coordination. Les deux

pathologies associées constituent une encéphalopathie traduite aussi par des troubles de la vigilance (somnolence, désorientation spatio-temporelle, confusion), des fabulations et des fausses reconnaissances. Une encéphalopathie porto-cave est également retrouvée dans l'évolution de la cirrhose hépatique. Elle est due au shunt porto-cave de l'hypertension portale et à l'insuffisance hépatique. Cette encéphalopathie associe une rigidité d'allure extrapyramidale, des tremblements distaux (« flapping tremor ») et des troubles de la conscience. À terme, l'évolution fatale peut se faire vers le coma hépatique qui résulte de la dégénérescence très marquée des cellules hépatiques.
Au niveau périphérique, l'intoxication alcoolique chronique entraîne une polynévrite sensitivomotrice des membres, inférieurs surtout, par carence en vitamines B, source de dégénérescence distale. Il y a une diminution progressive de la sensibilité, de la motricité et des réflexes ostéotendineux. Non traitée, cette polynévrite peut évoluer vers une paralysie et un état grabataire.

2. Système digestif

La consommation chronique de boissons alcoolisées (notamment de fort degré alcoolique) favorise les œsophagites, avec reflux gastro-œsophagien, et les gastrites augmentant le risque d'apparition de cancers. Au niveau de l'intestin grêle, l'alcoolisation chronique est la cause d'un syndrome de malabsorption qui vient s'ajouter aux carences nutritionnelles.
Le pancréas peut être le siège de pancréatites subaiguës ou chroniques, le plus souvent calcifiantes, qui évoluent vers des insuffisances exocrines ou parfois endocrines.
Sur le plan hépatique, différentes lésions histopathologiques vont s'enchaîner. La stéatose initialement asymptomatique peut s'accompagner d'hépatomégalie puis de cholestase. L'hépatite alcoolique est associée à une cytolyse, elle est parfois fébrile et douloureuse. La cirrhose est le résultat d'une fibrose de régénération, caractérisée initialement par une hépatomégalie régulière et ferme. Elle est souvent associée à des complications qui en font la gravité : ascite et œdèmes, ictère, surinfections, hémorragie digestive haute, carcinome hépatique, encéphalopathie.

3. Système vasculaire

Malgré le rôle vasculoprotecteur reconnu d'une très faible consommation régulière d'alcool, ce dernier, lors des intoxications chroniques, est responsable d'hypertension artérielle et de cardiomyopathie. Sur le plan veineux, l'hypertension portale par obstacle hépatique avec shunt porto-cave est un signe de gravité. Elle se traduit par la visualisation de la circulation veineuse superficielle abdominale et par des varices œsophagiennes. La rupture de ces dernières engage très souvent le pronostic vital. Au niveau du visage, la présence d'angiomes stellaires est très évocatrice.

4. Système hématologique

La macrocytose érythrocytaire, avec ou sans anémie, est pratiquement toujours constante. L'altération quantitative et/ou qualitative des leucocytes est souvent sans traduction clinique mais pourrait favoriser la fréquence et la durée des infections

chez le sujet à risque qu'est l'alcoolique. La thrombopénie, associée à l'hypoagrégabilité plaquettaire et à une diminution de la synthèse des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants, en cas d'insuffisance hépatique marquée, augmente le risque hémorragique. Celui-ci est à redouter au niveau des varices œsophagiennes.

5. Système endocrinien

Les traductions cliniques des modifications endocriniennes de l'alcoolisme chronique apparaissent souvent peu marquées sauf au stade terminal de la maladie. Globalement, mis à part la LH, tous les médiateurs endocriniens ont des sécrétions limitées. Elles peuvent être masquées, en début d'évolution, par l'effet souvent inverse de l'alcoolisation aiguë. À terme, la plupart des insuffisances endocriniennes (hypothalamo-hypophysaire, thyroïdienne, surrénalienne, gonadique) peuvent être présentes.

C. Sevrage

Les signes de sevrage apparaissent assez précocement après la dernière alcoolisation, donc souvent le matin au réveil. Ils sont d'intensité variable et seraient, sans traitement, d'installation progressive. Initialement, tremblements, pâleurs, sueurs souvent abondantes prédominent. Apparaissent ensuite une tachycardie (souvent avec hypertension artérielle), des nausées et des vomissements, des douleurs abdominales et une asthénie. Le malade anxieux est agité et s'oriente vers un état confuso-onirique. Celui-ci peut s'aggraver dans un tableau de *delirium tremens*, favorisé par des troubles biologiques, un traumatisme, des troubles psychiatriques préexistants. La malade a alors une désorientation spatio-temporelle avec hallucinations parfois terrifiantes. La survenue de crises comitiale est redoutée, surtout chez le sujet « à risque » ou lors des sevrages souvent répétés dans le temps. Le maximum de la symptomatologie est atteint vers le 3e et le 4e jour puis, sauf en cas de complication, décroît en quelques jours. Le malade demeure souvent anxieux et agité avec des accès dépressifs.

D. Syndrome d'alcoolisme fœtal

Le syndrome d'alcoolisme fœtal (SAF) survient à une fréquence et avec une gravité variables en fonction de l'alcoolisation chez les enfants nés de mères alcooliques. La physiopathologie du SAF est multifactorielle. Elle associe la toxicité propre de l'éthanol et de l'acétaldéhyde, les carences nutritionnelles, les carences hormonales et en éicosanoïdes, les modifications des neuromédiateurs. Le SAF peut se traduire par une prématurité, une dysmaturité, des malformations cardiaques, un retard mental peu réversible, une dysmorphie craniofaciale. Celle-ci est assez caractéristique avec microcéphalie, microphtalmie, brièveté des fentes palpébrales, télécanthus, macroglossie, aplatissement de la région maxillaire, petite lèvre supérieure. Les troubles organiques sont surtout en rapport avec une alcoolisation chronique pendant l'embryogenèse, les troubles de maturité avec une alcoolisation pendant la fœtogenèse. Le système nerveux central de l'unité embryofœtale est très sensible à l'alcool pendant toute la grossesse.

Le SAF est pratiquement constant pour des consommations quotidiennes supérieures à 100 g mais peut être constaté dès 20 g (ou moins ?). L'abstinence alcoolique doit donc être constante et totale pendant la grossesse. L'alcoolisation prénatale est en France la première cause de retard mental.

V. Biologie

Les modifications biologiques dues à la consommation d'alcool manquent souvent de spécificité ou de sensibilité. Elles sont cependant intéressantes dans le diagnostic, le pronostic ou le suivi des intoxications aiguës ou chroniques. Les perturbations neurochimiques ne seront pas évoquées ici.

A. Intoxication aiguë

1. Éthanolémie

Le dosage de l'éthanolémie, directement ou par l'intermédiaire de la quantité d'alcool présent dans l'air expiré, permet de « quantifier » la gravité de l'intoxication. Il faut cependant rappeler la grande variabilité individuelle et le fait que l'ivresse a une définition symptomatologique et non biologique.

2. Équilibre acido-basique

Une acidose métabolique est souvent observée par production accrue d'acides acétique et lactique. En cas de dépression respiratoire importante, elle est aggravée par une acidose respiratoire. Ces désordres peuvent être objectivés biologiquement.

3. Glycémie

En cas d'alcoolémies (très) élevées, l'hypoglycémie est souvent redoutée, l'alcool limitant la néoglucogenèse hépatique. Des hypoglycémies franches sont surtout retrouvées lorsqu'un jeûne est associé à la prise d'alcool ou chez l'enfant dont les réserves en glycogène hépatique sont faibles. Dans les cas extrêmes, cette hypoglycémie s'accompagne d'acidocétose. L'hypoglycémie peut également survenir en phase de post-ivresse.

4. Acide urique

Une hyperuricémie secondaire à l'acidose, notamment lactique, qui diminue la clairance rénale de l'acide urique, est classiquement décrite. Elle peut, chez le sujet à risque, gros mangeur avec hyperuricémie antérieure, favoriser une crise de goutte.

5. Eau, électrolytes

L'alcoolisation aiguë entraîne une polyurie par réduction de l'hormone antidiurétique et de la résorption tubulaire de l'eau. La clairance de l'eau libre augmente

avec, parallèlement, une diminution de l'excrétion des ions Na^+, K^+ et Cl^-. Une hypertonie osmotique avec déshydratation cellulaire peut alors apparaître. Une alcoolémie de 1 g/L augmente l'osmolalité d'environ 22 mmol/kg d'eau.
L'éthylisme aigu à la bière est souvent associé à une hyponatrémie.

B. Intoxication chronique

Certains marqueurs biologiques sont classiquement employés comme indicateurs d'une consommation chronique excessive.

1. Gamma-glutamyl-transférase (GGT)

La gamma-glutamyl-transférase (GGT) est le marqueur le plus couramment utilisé, sa synthèse étant induite par l'éthanol. Elle est cependant assez peu sensible et peu spécifique, de nombreuses autres étiologies (hépatiques ou non) pouvant augmenter sa concentration sérique notamment les autres xénobiotiques inducteurs. Le dosage de GGT permet surtout de contrôler l'arrêt de consommation d'alcool, sa demi-vie biologique étant d'environ 15 jours.

2. Volume globulaire moyen (VGM)

Le volume globulaire moyen (VGM), reflet de la macrocytose éthylique, est sensible aux mêmes types de critiques. Les carences vitaminiques (folates, B12), diverses pathologies hématologiques, néoplasiques ou autres, augmentent également la valeur du VGM. Le dosage simultané de la GGT et du VGM peut améliorer l'argumentaire mais sans certitude.

3. Aminotransférases (transaminases)

Les aminotransférases élevées sont des marqueurs tardifs qui traduisent une cytolyse hépatique. Le rapport ASAT/ALAT supérieur à 1 apporte une certaine spécificité alcoolique vis-à-vis des autres causes cytolytiques.

4. Transferrine désialylée (CDT)

La transferrine désialylée (CDT) est actuellement reconnue comme l'un des marqueurs les plus sensibles, l'alcool inhibant les sialyl-transférases. L'augmentation de la concentration sérique de la CDT (de demi-vie plus courte que la GGT) est un indicateur de choix dans le dépistage, même précoce, des buveurs excessifs et dans le suivi du maintien de l'abstinence. Ce dosage devrait être fait dans ces buts de plus en plus largement.

5. Divers

D'autres paramètres biochimiques peuvent être modifiés. Les hypertriglycéridémies dues à l'excès d'ions H^+ provenant du catabolisme de l'alcool sont assez fréquentes. Les glycémies hautes ou basses ne sont en rapport qu'avec un diabète non insulinodépendant ou une dénutrition extrême associés. Une rétention sodée par hyperaldostéronisme secondaire peut nécessiter un traitement par la spironolac-

tone, notamment en cas d'ascite cirrhotique. Cette dernière, qui est un transsudat, est généralement pauvre en protéines. L'insuffisance hépatique sévère se traduit par une diminution de synthèse de l'albumine et des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants. En cas de cirrhose, l'élévation des immunoglobulines (G et M) réalise le classique bloc bêta-gamma à l'électrophorèse. L'élévation du rapport immunoglobuline A/transferrine est également évocateur d'une cirrhose éthylique mais son apparition tardive limite son intérêt.

VI. Traitement

Les attitudes thérapeutiques devant une intoxication éthylique aiguë ou une tentative de désaccoutumance sont bien sûr différentes.

A. Intoxication aiguë

La prise en charge peut, dans les cas bénins, ne justifier qu'une surveillance attentive et un traitement symptomatique. L'évacuation digestive n'est efficace qu'en cas d'ingestion (très) importante vue précocement ou associée à des médicaments. Le charbon activé est pratiquement sans effet. Il n'y a pas de remède miracle pour faire baisser rapidement l'alcoolémie (l'absorption de fructose reste très discutable) ou améliorer l'état neurologique du malade. La naloxone peut parfois permettre une sortie spectaculaire du coma. Le traitement symptomatique en position latérale de sécurité (si le malade n'est pas intubé) prévient ou traite les troubles respiratoires (oxygénothérapie), assure une bonne hydratation par voie orale ou parentérale. En milieu médicalisé, un bilan biochimique permet de corriger les éventuels troubles constatés. Chez l'alcoolique chronique, l'administration de vitamine B1 par voie parentérale doit, obligatoirement, précéder celle d'apport glucosé (consommateur de B1) dans la crainte de provoquer une encéphalopathie.
En cas de patient agité et violent, l'isolement s'impose, la sédation verbale doit être essayée. L'administration parentérale d'un neuroleptique sédatif est réservée aux cas sévères après avoir pesé le risque d'interaction avec l'alcool.
Lorsque le pronostic vital paraît engagé, pour des alcoolémies voisines ou supérieures à 5 g/L, le recours à l'hémodialyse est envisageable, l'alcool étant dialysable.

B. Intoxication chronique

Le traitement de l'intoxication chronique est souvent celui de la dépendance à l'alcool, qui est une conduite addictive. Ce traitement, réalisable en ambulatoire ou en structures spécialisées, n'est envisageable que chez le sujet volontaire, motivé, ayant pris conscience de sa maladie. Il s'effectue en deux temps : sevrage puis maintien de l'abstinence.

1. Sevrage

Il s'agit d'arrêter toute prise d'alcool à un jour convenu avec le malade. Les signes physiques de la dépendance apparaissant dès que l'alcoolémie est proche de zéro,

le traitement doit débuter précocement pour lutter contre l'hypofonctionnement GABAergique et l'hyperactivité noradrénergique. Parmi les nombreux tranquillisants utilisables, les benzodiazépines anxiolytiques d'assez longue demi-vie (oxazépam, diazépam) sont les plus utilisées. Elles ont un effet anticomitial et améliorent le confort psychologique du malade. En raison de la tolérance neurochimique croisée entre l'alcool et les benzodiazépines, les posologies initiales sont élevées puis réduites avec arrêt possible, en une ou deux semaines. Une bonne hydratation est nécessaire ainsi qu'une vitaminothérapie B1 et B6. En fonction du contexte, ces médicaments sont administrés par voie orale ou intraveineuse. Si les signes de sevrage, notamment cardiovasculaires noradrénergiques, sont marqués, la prescription de clonidine ou de bêtabloquants peut être associée. Une approche thérapeutique psychologique est souvent indispensable.

2. Maintien de l'abstinence

Il n'y a, en principe, pas lieu de poursuivre un traitement psychotrope sauf en cas de pathologies psychiatriques préexistantes ou révélées par le sevrage : anxiété ou dépression le plus souvent.

Seuls deux médicaments ont comme indication l'aide au maintien de l'abstinence à l'alcool, c'est-à-dire la diminution du risque de rechute. L'acamprosate est un agoniste GABAergique et un antagoniste des récepteurs NMDA dont il va pouvoir moduler l'expression, notamment après une sensibilisation par l'alcool. La durée recommandée du traitement est de un an. La naltrexone est un antagoniste des opioïdes endogènes dont elle va pouvoir supprimer les effets gratifiants de « renforcement » positif lors des conduites d'alcoolisation. L'acamprosate et la naltrexone permettent de réduire la fréquence des rechutes. L'utilisation de l'un ou l'autre de ces médicaments dépend en principe du « profil » neurochimique du malade. La prescription simultanée des deux est de plus en plus fréquente.

Dans de nombreux cas, la prescription de disulfirame peut se révéler utile et permet au malade de passer un contrat avec lui-même. Il sait en effet que la prise matinale de disulfirame lui interdit toute consommation d'alcool dans la journée, l'association générant un effet Antabuse marqué. En cas de véritables compulsions à boire, l'administration ponctuelle de BZD limite le risque de ré-alcoolisation.

Le recours à une psychothérapie individuelle, familiale ou de groupe est souvent capital. Les mouvements d'aide aux malades alcooliques, animés par d'anciens buveurs, sont à ce titre très appréciés.

VII. Analyse de l'éthanol

L'identification et le dosage de l'éthanol chez un individu ont pour but d'apporter une réponse sur l'imprégnation éthylique dans le cadre de la répression de l'ivresse publique, de la surveillance des conducteurs de véhicules, de l'analyse toxicologique ou de l'expertise légale. Les milieux les plus utilisés sont l'air expiré et le sang.

A. Analyse de l'air expiré (air alvéolaire)

Le principe de cette analyse repose sur l'élimination pulmonaire de l'éthanol avec, à l'équilibre, une quantité moyenne d'éthanol identique dans 1 mL de sang et dans 2 100 mL d'air. L'élimination pulmonaire est cependant sujette à de larges fluctuations.
Deux techniques sont qualitatives, une est quantitative.

1. Examen qualitatif

a) Alcootest

Il s'agit d'un dispositif à usage unique, comportant un tube réactif et un ballon en polyéthylène. Après une inspiration forcée et une apnée de 30 secondes, pour atteindre l'équilibre sang/air, on fait passer l'air d'expiration en une fois à travers un tube contenant un mélange de H_2SO_4, de gel de silice et de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Le dégagement de chaleur, entraîné par l'humidité de l'air réagissant avec l'acide sulfurique, est suffisant pour que l'alcool réduise le bichromate de potassium jaune en sels de chrome vert. La longueur de la teinte verte est proportionnelle à la teneur en composé réducteur (alcools, aldéhydes…). Ce système manque de spécificité et de précision. Il ne doit pas être utilisé dans les 15 minutes qui suivent l'absorption de boissons ou l'utilisation d'une cigarette. Tout résultat positif doit être confirmé par une éthanolémie.

b) Éthylotest

C'est un appareil de dépistage à usages multiples. Il repose sur le principe de la génération d'un courant électrique dans une cellule de mesure de type pile à combustible par oxydation de l'éthanol sur les électrodes. Il présente les mêmes inconvénients que l'alcootest.

2. Examen quantitatif : l'éthylomètre

L'éthylomètre permet d'apporter la preuve légale de l'imprégnation éthylique. Il fonctionne soit comme l'éthylotest, soit sur le principe de l'analyse d'un spectre infrarouge entre 3,3 et 3,5 µm (liaison HC) ou à 9,4 µm (liaison OH).

B. Analyse de sang

L'analyse doit s'effectuer sur sang total. Le rapport alcool/plasma ou sérum/alcool dans le sang total est en moyenne de 1,10. Il existe trois types de méthodes : chimiques, chromatographiques et enzymatiques.

1. Méthode chimique : méthode de Cordebard

C'est la méthode officielle la plus ancienne. Elle consiste en une séparation de l'éthanol par distillation en présence d'acide picrique (action défécatrice et anti-mousse) et recueil du distillat. Ensuite, l'éthanol est dosé en utilisant ses propriétés réductrices vis-à-vis d'une solution nitrochromique à froid et en excès. L'excès

d'oxydant est dosé en retour par iodométrie. Un essai à blanc doit être pratiqué en parallèle (remplacement du distillat par de l'eau distillée) (*voir figure 4*). La méthode est longue, utilise beaucoup de sang (5 mL) et demeure peu spécifique.

$$Cr_2O_7^{--} + 14H_3O^+ + 6e^- \rightleftharpoons 2Cr^{3+} + 21H_2O$$

$$6I^- \rightleftharpoons 6I^\circ + 6e^-$$

$$\text{Soit } Cr_2O_7^{--} + 14H_3O^+ + 6I^- \rightleftharpoons 3I_2 + 2Cr^{3+} + 21H_2O$$

$$CH_3CH_2OH + H_2O \rightleftharpoons CH_3COOH + 4H^+ + 4e^-$$

$$\text{d'où l'équivalent} = \left(\frac{46}{4}\right) \text{ ou } \frac{MOLE}{4} \text{ soit } 11{,}5 \text{ g.éq}^{-1}$$

Schéma réactionnel

$$\left[\underset{\mathbf{N}\text{ mL} - \mathbf{n}\text{ mL}}{(\text{Témoin} - \text{Dosage})} \times \underset{\text{en normalité ou molarité}}{\text{titre thiosulfate}} \times \underset{\text{valeur de l'équivalent}}{\frac{MOLE}{4}}\right] = \text{mg d'éthanol dans la prise d'essai du dosage}$$

Figure 4. Dosage de l'éthanol : méthode nitrochromique de Cordebard

2. Méthode chromatographique (CPG)

Cette méthode est officiellement reconnue depuis 1986. Elle utilise la volatilité de l'éthanol. Pour préparer l'échantillon, trois protocoles sont applicables :

- injection directe après dilution par addition de l'étalon interne ;
- injection directe après addition de l'étalon interne et défécation ;
- injection de l'espace de tête (« head space ») après adjonction de l'étalon interne et chauffage.

L'étalon interne le plus souvent retenu est le n-propanol.
La détection s'effectue par ionisation de flamme.
Cette technique est simple, rapide (moins de 10 minutes), spécifique, sensible et utilise peu de sang (moins de 1 mL).

3. Méthode enzymatique

Cette méthode très simple utilise l'alcool déshydrogénase (ADH ; EC 1.1.1.1) qui oxyde l'éthanol en acétaldéhyde tout en réduisant le NAD en NADH. La formation de NADH, qui est proportionnelle à la quantité d'éthanol, est suivie soit par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, soit par réfractométrie.

Cette technique est peu spécifique (interférence d'autres alcools, parfois de LDH ou de lactates) et les effets de matrice (hémolyse, ictère) peuvent interférer. Cependant, il existe des kits avec des ADH « spécifiques » de l'éthanol (issues de levures) qui ne croisent plus avec le méthanol ou l'éthylène glycol.

C. Considérations légales

La législation française, depuis la loi du 15 avril 1954, a codifié la procédure de prélèvement des échantillons de sang (2 flacons de 10 mL sur fluorure de sodium comme anticoagulant) après désinfection de la peau par des antiseptiques non alcooliques. Les deux flacons sont accompagnés de deux fiches, une rouge et une verte (la rouge A pour l'examen du comportement, la verte avec deux parties : B pour l'examen clinique et C pour l'analyse de sang). La présentation de ces fiches a été modifiée en 1996 (*JO* du 6 mars).

Actuellement, la législation en matière de conduite automobile est régie par la loi nº 2003-495 du 12 juin 2003 (*JO* du 13 juin 2003) qui prévoit que :

- même en l'absence de tout signe d'ivresse manifeste, le fait de conduire un véhicule sous l'empire d'un état alcoolique caractérisé par une concentration d'alcool dans le sang égale ou supérieure à 0,80 g/L ou par une concentration d'alcool dans l'air expiré égale ou supérieure à 0,40 mg/L constitue un délit, est punissable d'une peine de deux ans d'emprisonnement et de 4 500 euros d'amende, d'un retrait de six points du permis de conduire, d'une suspension de celui-ci, voire de son annulation ;
- le fait de conduire un véhicule en état d'ivresse manifeste est puni des mêmes peines ;
- en cas d'homicide involontaire, la peine peut aller à sept ans de prison et 100 000 euros d'amende. En cas de conduite sans permis de conduire ou de délit de fuite, la loi prévoit dix ans d'emprisonnement et 150 000 euros d'amende.

Les textes relatifs au Code de la route comportent, dans le chapitre IV (conduite sous l'influence de l'alcool), l'article R. 234-1 et des compléments d'informations. Ainsi, même en l'absence de tout signe d'ivresse manifeste, est puni de l'amende prévue pour les contraventions de la quatrième classe le fait de conduire un véhicule sous l'empire d'un état alcoolique caractérisé :

- par une concentration d'alcool dans le sang égale ou supérieure à 0,20 g/L ou par une concentration d'alcool dans l'air expiré égale ou supérieure à 0,10 mg/L et inférieure aux seuils fixés par l'article L. 234-1, pour les véhicules de transport en commun ;
- pour les autres catégories de véhicules, par des concentrations d'alcool respectivement supérieures ou égales à 0,50 g/L (sang) ou 0,25 mg/L (air expiré).

La contravention est sanctionnée par une amende forfaitaire de 135 euros, une perte de six points maximum du permis de conduire ainsi que sa suspension jusqu'à trois ans.

Sur le plan analytique, pour la détermination de l'éthanolémie, les textes en vigueur ne reconnaissent que deux méthodes de dosage de l'alcool dans le sang : la méthode chimique de Cordebard (*JO* du 30 novembre 1972) et la chromatographie en phase gazeuse (arrêté du 6 mars 1986, *JO* du 16 mars 1986, p. 4365).

Dans le domaine du sport, l'alcool (éthanol) est classé dans les substances interdites, seulement en compétition, dans certains sports (classe P1 - Alcool). La

détection est effectuée par éthylomètre et/ou analyse sanguine. Les seuils de « violation » sont les suivants (1er janvier 2006) :

- 0,30 g/L : motonautique (UIM),
- 0,20 g/L : aéronautique (FAI), billard (WCBS),
- 0,10 g/L : automobile (FIA), boules (CMSB, IPC boules), karaté (WKF), motocyclisme (FIM), pentathlon moderne (UIPM) pour les épreuves comportant du tir, et tir à l'arc (FITA, IPC).

L'exposition professionnelle peut conduire à une maladie professionnelle (tableau n° 84 du régime général).

L'essentiel de la question

L'éthanol, petite molécule hydrophile et lipophile, se distribue dans tout l'organisme après résorption digestive ou pulmonaire. L'élimination en nature est faible. La majorité de l'éthanol (90 à 95 %) subit un catabolisme oxydatif en acétaldéhyde, acétate, CO_2 et H_2O. L'acétaldéhyde est obtenu par trois voies (alcool déshydrogénase, voie du *microsomal éthanol oxidizing system* ou CYP2E1 et catalase). La voie physiologique (ADH) produit du NADH. L'ALDH1 est inhibée par les pyrazolés, l'ALDH2 peut, par déficience, entraîner un « flush ». L'acétate est dégradé en CO_2 et H_2O. L'éthanol, bien que fournissant 7,1 kcal/g, est un mauvais nutriment.
Le mécanisme d'action toxique de l'éthanol en alcoolisation aiguë concerne le système nerveux central par modification du système GABAergique. En alcoolisation chronique, on observe un effet sur le SNC, mais les effets se manifestent surtout au niveau du foie (stéatose, hépatite, fibrose), du tube digestif (irritation), du pancréas (pancréatites), du système cardiovasculaire (myocardiopathie, fibrose, hypertriglycéridémie), des systèmes endocriniens et hématopoïétiques.
La symptomatologie de l'intoxication aiguë ou ivresse alcoolique évolue en trois phases : excitation psychomotrice, puis instabilité avec incoordination, enfin coma profond et calme. Les interactions alcools/xénobiotiques tant pharmacocinétiques que pharmacodynamiques ne doivent pas être ignorées.
L'intoxication chronique ou alcoomanie entraîne sur le SNC un cycle dépendance-tolérance-sevrage, et sur le SN périphérique une polynévrite. Sur le TD on note des œsophagites, des gastrites compliquées par une malabsorption intestinale, des pancréatites, mais la cible essentielle demeure le foie avec stéatose, cholestase, cytolyse. L'atteinte hématologique majeure concerne la macrocytose érythrocytaire, des risques accrus d'infection (leucocytes) et d'hémorragie (hypoagrégabilité plaquettaire, diminution des facteurs vitamines K-dépendants). Enfin, il ne faut pas oublier le syndrome d'alcoolisme fœtal.
Les modifications biologiques, quoique peu spécifiques, doivent aider dans le diagnostic, le pronostic ou le suivi des intoxications. Ainsi, en intoxication aiguë, en plus de l'éthanolémie mesurée par méthode chimique (Cordebard) ou chromatographique (CPG), il faudra suivre l'équilibre acido-basique, la glycémie et l'acide urique. En intoxication chronique, on mesurera la GGT, le VGM, la transferrine désialylée. Le traitement de l'intoxication aiguë comprend la prise en charge du malade adapté en fonction de la clinique. L'essentiel concerne la surveillance biologique.
Le traitement de l'intoxication chronique consiste en une cure de sevrage avec maintien de l'abstinence.

Pour en savoir plus

- Deveaux M. « Alcool éthylique », in *Toxicologie et pharmacologie médico-légales*. Elsevier, 1998 : 111-126.
- Dolbeault S., Girre C. Dépendance alcoolique. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie – Pathologie professionnelle, 16-001-G-70 : 1-8.
- Ducluzeau R., Meyran S. « Intoxications par monoalcools : alcool éthylique, alcool isopropylique », in *Intoxications aiguës en réanimation*, 2e éd. Arnette, 1999 : 111-129.
- Girre C., Hispard E. Législation se rapportant à l'alcoolisme et sa prévention. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie – Pathologie professionnelle, 16-047-A-21 : 1-4.
- Girre C., Hispard E., Tuszynski T. Toxicité de l'éthanol. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie – Pathologie professionnelle, 16-047-A-20 : 1-20.
- INRS, Fiche toxicologique n° 48.
- Lamiable D., Hoizey G., Marty H., Vistelle R. Intoxication aiguë à l'éthanol. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie - Pathologie Professionnelle, 16-025-A-10 : 1-3.
- Nordman R. Métabolisme de l'alcool. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Endocrinologie – Nutrition, 10-384-A-10 : 1-7.
- Zhao Y., Riou B. « Urgences alcooliques », in Carli P., Riou B. et Télion C., *Urgences médico-chirurgicales de l'adulte*, 2e éd. Arnette, 2004 : 896-901.

Toxicologie des antidépresseurs

L. VERNHET, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, université Rennes-I.

La dépression se caractérise par une modification profonde de l'humeur dans le sens de la tristesse, de la souffrance morale et du ralentissement psychomoteur. Cet état entretient chez le patient un sentiment de culpabilité, de fatalité et d'impuissance pouvant conduire à des tentatives de suicide. La prise en charge de la dépression repose sur trois stratégies thérapeutiques : la chimiothérapie, l'électro-convulsivothérapie et la psychothérapie. Le choix entre ces différents traitements s'effectue en fonction de critères tels que la rapidité d'action, l'efficacité, les effets secondaires ou le coût. L'intoxication aiguë, volontaire ou non, par les antidépresseurs est une cause encore fréquente d'admission aux urgences. La gravité de l'intoxication par les antidépresseurs tricycliques, notamment chez l'enfant, doit être connue ; cette intoxication sera donc plus particulièrement développée dans ce chapitre.

I. Classification des antidépresseurs

Les médicaments antidépresseurs commercialisés en France pour les épisodes dépressifs sont aujourd'hui classés en quatre groupes (Afssaps, 2005) :

- les antidépresseurs tricycliques imipraminiques (ADT), qui demeurent les médicaments les plus dangereux lors de prises massives ;
- les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline ;
- les inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO), sélectifs et non sélectifs ;
- les antidépresseurs de mécanismes pharmacologiques différents.

II. Toxicité des antidépresseurs tricycliques (ADT)

Les ADT sont des médicaments encore très utilisés dans le traitement de la dépression. Ils sont formés de trois cycles dont le cycle central est constitué de 7 atomes (*fig. 1*). Sur le plan chimique, les ADT disponibles sur le marché regroupent des dérivés des dibenzazépines (imipramine, clomipramine, trimipramine), un dérivé du dibenzocycloheptadiène (amitriptyline), un dérivé de la dibenzodiazépine (amoxapine), un dérivé de la dibenzoxépine (doxépine) et un dérivé de la dibenzothiépine (dosulépine). La maprotiline, qui est apparentée aux ADT au niveau pharmacologique et toxicologique, est un antidépresseur tétracyclique.

Comme les autres antidépresseurs, les ADT agissent au niveau du système nerveux central en modulant les concentrations de neurotransmetteurs libérés dans les fentes synaptiques. Les ADT semblent agir principalement en bloquant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline par inhibition des transporteurs situés sur la terminaison du neurone présynaptique.

N

$CH_2CH_2CH_2N(CH_3)_2$

Imipramine (**Tofranil®**)

Cl N

$CH_2CH_2CH_2N(CH_3)_2$

Clomipramine (**Anafranil®**)

N

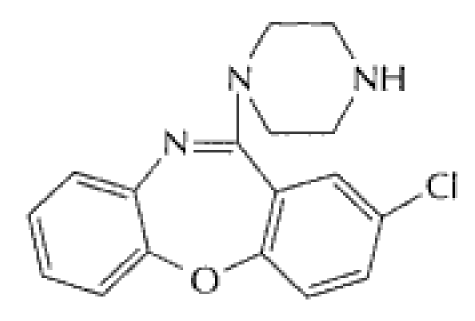
$CH_2CHCH_2N(CH_3)_2$

CH_3

Trimipramine (**Surmontil®**)

$CHCH_2CH_2N(CH_3)_2$

Amitriptyline (**Laroxyl®, Elavil®**)

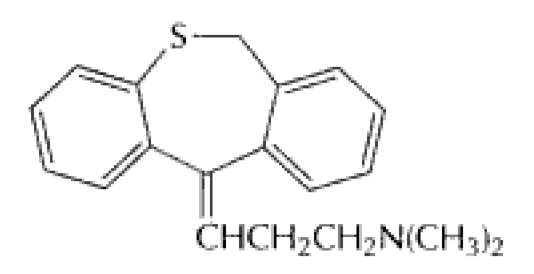


Amoxapine (**Défanyl®**)

O

$CHCH_2CH_2N(CH_3)_2$

Doxépine (**Quitaxon®**)



Dosulépine (**Prothiaden®**)

$CH_2CH_2CH_2NHCH_3$

Maprotiline (**Ludiomil®**)

Figure 1. Structure chimique des antidépresseurs tricycliques imipraminiques

A. Toxicocinétique des antidépresseurs

Aux doses thérapeutiques, les ADT sont rapidement absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal. En cas d'ingestion massive, ces composés basiques sont séquestrés sous forme ionisée dans le milieu gastrique. Ce phénomène, associé à leurs propriétés anticholinergiques ralentissant le péristaltisme, induit une absorption digestive plus lente lors de l'intoxication aiguë. Les ADT sont des molécules lipophiles se liant fortement aux protéines plasmatiques. Ces médicaments ont une grande affinité tissulaire pour le foie, le cerveau, le rein et le myocarde, et possèdent donc un large volume de distribution. La fixation intracellulaire élevée des ADT explique les taux plasmatiques très bas de ces médicaments (environ 1 mg/L). Les demi-vies plasmatiques des ADT sont assez longues et augmentées lors d'une prise massive de médicaments.
Les ADT sont généralement fortement métabolisés au niveau du foie par les cytochromes P450 (CYP1A2, CYP2D6 et CYP3A4) (*fig.* 2). Les voies du métabolisme sont essentiellement : la déméthylation oxydative (1), la N-oxydation (2), l'hydroxylation (3) et la rupture oxydative de la chaîne latérale (4). La N-monodéméthylation oxydative est une voie majeure produisant des métabolites pharmacologiquement actifs. Les ADT et leurs métabolites subissent généralement un cycle entéro-hépatique et les produits polaires sont éliminés par les urines. Moins de 1 % des ADT sont éliminés sous forme inchangée.

B. Manifestation cliniques

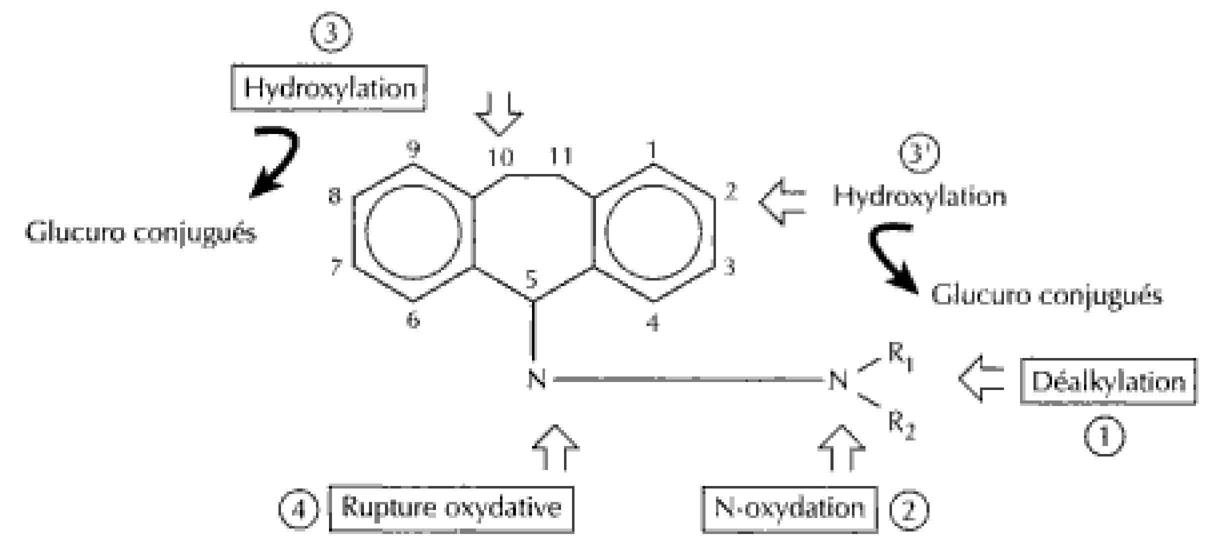
La symptomatologie de l'intoxication aiguë par les ADT est dominée par des troubles neurologiques et cardiaques.

1. Signes neurologiques

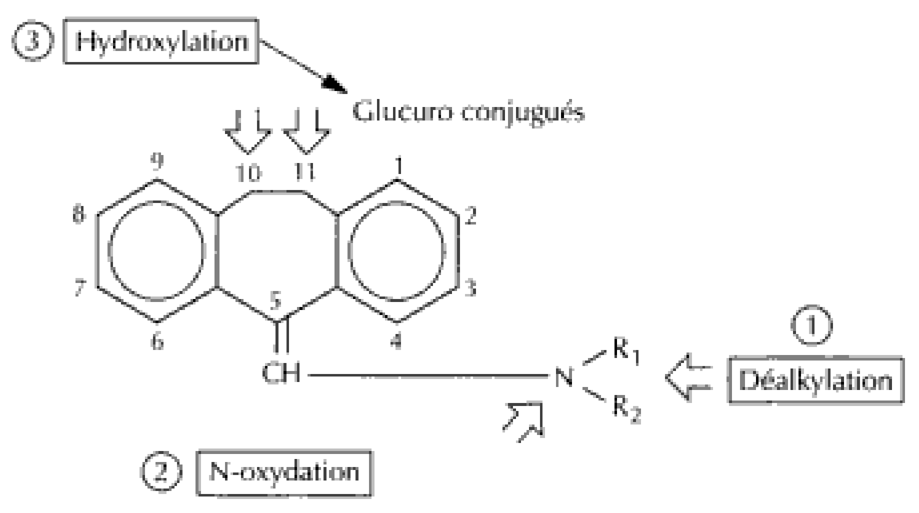
Les premiers troubles de la conscience apparaissent généralement après un délai de 1 à 4 heures suivant l'ingestion des ADT. Dans 60 % des cas, un coma est observé. Il s'agit habituellement d'un coma de profondeur modérée avec agitation, hypertonie et hyperréflexie tendineuse. Ce coma se dissipe assez rapidement en 24 à 48 heures. Des crises convulsives généralisées, rapidement résolutives, peuvent survenir dans les premières heures de l'intoxication. La prise associée de médicaments psychotropes modifie la profondeur du coma et la sémiologie. Le coma sera généralement plus profond et la dépression respiratoire peut être importante.

2. Signes anticholinergiques

Les signes anticholinergiques, fréquents, sont responsables des troubles de la conscience pouvant précéder le coma. Ils peuvent associer agitation, hallucinations, délire, mydriase non réactive, tremblement des extrémités, syndrome pyramidal diffus, rétention urinaire et tachycardie sinusale.



Cas de l'imipramine



Cas de l'amitriptyline

Figure 2. Biotransformation de l'imipramine et de l'amitriptyline

3. Troubles cardiaques

La gravité des intoxications par les ADT résulte de l'intensité des troubles cardio-vasculaires qu'elles entraînent. Ces troubles sont liés principalement à deux mécanismes physiopathologiques distincts dépendant de la dose de médicament ingérée. Les premiers signes d'atteinte cardiaque résultent des effets anticholinergiques et de l'augmentation des concentrations plasmatiques des catécholamines ; ils se manifestent généralement par une tachycardie sinusale régulière peu préoccupante, pour une dose d'ADT ingérée inférieure à 1 g chez l'adulte. Des signes plus graves d'atteinte cardiaque s'observent pour des doses généralement supérieures à 1,5 g chez l'adulte. Il s'agit alors d'une action directe des ADT sur les cellules myocardiques : des études d'électrophysiologie ont démontré que ces antidépresseurs ont un effet stabilisant de membrane par inhibition du courant sodique entrant de la phase 0 du potentiel d'action ; les ADT perturberaient également les courants calciques. Ces effets se manifestent sur le plan électrocardiographique par un allongement de l'espace QT et un allongement du complexe QRS traduisant

des troubles majeurs de la conduction intraventriculaire. Ces troubles favorisent le déclenchement de tachycardies ventriculaires graves telles que des torsades de pointes par un mécanisme de réentrées à l'étage ventriculaire. À ce niveau d'atteinte myocardique, les ADT ont des effets inotropes négatifs pouvant entraîner une hypotension et, dans les situations les plus graves, une insuffisance circulatoire mixte cardiogénique et vasoplégique. Les effets stabilisants de membrane ne sont pas spécifiques des ADT et peuvent survenir lors d'une intoxication aiguë par d'autres médicaments (antiarythmiques, phénothiazines à fortes doses, antipaludéens, dextropropoxyphène…).

C. Facteurs de gravité

L'intoxication aiguë par les ADT est potentiellement grave, mais la mortalité reste toutefois inférieure à 1 % lorsque les patients sont pris en charge rapidement à l'hôpital. Les critères de gravité de l'intoxication sont d'ordre clinique, électrocardiographique et toxicologique.

1. Signes cliniques

Il s'agit de la survenue de crises convulsives, de dépression respiratoire, de troubles de la conscience et d'hypotension.

2. Signes électrocardiographiques

L'élargissement du complexe QRS au-delà de 160 ms est associé à un risque élevé d'arythmie ; ce risque devient négligeable en dessous de 100 ms.

3. Critères toxicologiques

L'ingestion d'une quantité d'ADT supérieure à 1,5 g est susceptible de provoquer une intoxication sévère, voire mortelle au-delà de 2 g. La dose toxique chez l'enfant est estimée à 5 mg/kg et la dose létale serait voisine de 10 mg/kg. Le pronostic est généralement corrélé au taux plasmatique des ADT ; en dessous de 1 mg/L, l'intoxication reste mineure. La gravité de l'intoxication résulte également de l'association des ADT avec les antidépresseurs IMAO ou ISRS, qui accroissent les risques d'atteinte cardiaque grave et de convulsions.

D. Traitement des intoxications aiguës

Comme pour toute intoxication, le traitement présente trois composantes : le traitement épurateur ou évacuateur, le traitement symptomatique et le traitement spécifique.

1. Décontamination gastro-intestinale

Le lavage gastrique peut être pratiqué étant donné la gravité potentielle de ces intoxications, toutefois il doit être réalisé très rapidement, durant la première heure

suivant l'ingestion. L'administration répétée de charbon activé présente des avantages théoriques (adsorption du médicament et interruption du cycle entéro-hépatique), mais son intérêt chez le sujet intoxiqué n'a pas été réellement démontré.

2. Traitement symptomatique

La prise en charge symptomatique vise à traiter les troubles de la conscience, la dépression respiratoire, les convulsions et les troubles cardiaques.

Les manifestations centrales et périphériques liées aux propriétés anticholinergiques des ADT peuvent être traitées par des médicaments anticholinestérasiques tels que la physostigmine ; toutefois, ces médicaments ne pourront pas améliorer les troubles cardiovasculaires secondaires à l'effet stabilisant de membrane des ADT. Ce dernier sera traité par l'injection intraveineuse de solutions molaires de lactate ou de bicarbonate de sodium, qui induisent une alcalinisation. Ce traitement permet de normaliser le plus souvent la pression artérielle et d'améliorer la conduction intraventriculaire.

La surveillance électrocardiographique est très importante afin de corriger la durée du complexe QRS.

Il semble que les deux composantes du traitement, c'est-à-dire l'apport de sodium et l'alcalinisation, jouent un rôle dans l'amélioration de l'état du patient. En revanche, l'inconvénient de l'alcalinisation est de provoquer une hypokaliémie qu'il est indispensable de prévenir par la co-administration de KCl.

La prise en charge des collapsus persistants repose le plus souvent sur l'administration de noradrénaline ou d'adrénaline.

3. Traitement spécifique

Il est possible d'administrer des anticorps spécifiquement dirigés contre les ADT lors d'intoxications sévères. Cette immunotoxicothérapie permet d'améliorer les troubles cardiovasculaires ; elle nécessite cependant d'administrer des quantités importantes d'anticorps. L'usage des anticorps est aujourd'hui limité par leur coût et par leur toxicité rénale potentielle.

E. Toxicologie analytique

Les ADT se présentent sous forme de poudre cristalline blanche ou légèrement jaunâtre, soluble à l'état de base dans les solvants organiques mais insolubles dans l'eau. Il est possible de rechercher les ADT directement dans les milieux biologiques en utilisant des techniques d'immunofluorescence (FPIA). Toutefois, il faut noter que la maprotiline, de structure tétracyclique, n'est pas détectables par les techniques immunologiques classiques. Pour identifier et quantifier précisément les ADT dans le sang ou les urines, il est nécessaire de réaliser une extraction par un solvant organique type dichlorométhane. Après concentration de la phase organique sous pression réduite, l'extrait organique peut être analysé par des techniques chromatographiques classiques : chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne polaire et détection par spectrométrie de masse, ou chromatographie liquide haute performance et détection dans l'ultraviolet (barrette de diodes) ou par fluorimétrie.

En cas d'ingestion massive d'ADT, les taux sériques sont de 1 à 3 mg/L dans les heures qui suivent la prise et persistent quelques jours entre 0,5 et 2 mg/L. Un taux supérieur à 1,5 mg/L est d'un mauvais pronostic.

III. Toxicité des ISRS et des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

Les ISRS occupent le premier rang des prescriptions d'antidépresseurs. Cette famille regroupe la fluoxétine (Prozac®), la fluvoxamine (Floxyfral®), la paroxétine (Deroxat®), le citalopram (Séropram®), la sertraline (Zoloft®) et l'escitalopram (Seroplex®) (*fig.* 3). Les ISRS bloquent la protéine de transport assurant la recapture de la sérotonine dans le neurone présynaptique. Ces antidépresseurs sont sans effet stabilisant de membrane.

F_3C–C_6H_4–$OCH(CH_2)_2NHCH_3$ (avec C_6H_5)

Fluoxétine **(Prozac®)**

F_3C–C_6H_4–$C(=NO(CH_2)_2NH_2)$–$(CH_2)_4OCH_3$

Fluvoxamine **(Floxyfral®)**

NH, OCH_2, O, O, F

Paroxétine **(Déroxat®)**

NC, O, F, $CH_2CH_2CH_2N(CH_3)_2$

Citalopram **(Séropram®)**

Figure 3. Structure chimique des ISRS

L'intoxication aiguë secondaire à l'ingestion d'ISRS seuls est le plus souvent bénigne. D'une façon générale, l'intoxication se manifeste par des troubles digestifs non spécifiques associés ou non à des signes anticholinergiques, des troubles neurologiques et parfois des troubles cardiovasculaires. Les troubles neurologiques sont variables et consistent en une somnolence, des vertiges, de l'anxiété ou parfois des convulsions. Les troubles cardiovasculaires sont le plus fréquemment limités à des perturbations de l'électrocardiogramme (allongement de l'espace QT notamment) sans signe clinique associé. La survenue d'arythmies ventriculaires, secondaires aux troubles de la repolarisation, semble exceptionnelle. L'ensemble de ces

troubles est d'évolution favorable en 24 heures. L'intoxication consécutive à l'ingestion simultanée d'ISRS et d'ADT ou d'IMAO, même à doses thérapeutiques, est par contre beaucoup plus grave. Ces associations sont à l'origine d'un syndrome sérotoninergique parfois sévère, pouvant mettre le pronostic vital en jeu. La physiopathologie du syndrome sérotoninergique est en relation avec une augmentation des concentrations de sérotonine dans le tissu cérébral. La forme grave du syndrome sérotoninergique regroupe un ensemble de symptômes psychiques (agitation, confusion, convulsion), moteurs (tremblements, myoclonies, hypertonie puis rigidité musculaire) et végétatifs (mydriase, hyperthermie, sueurs, frissons, pression artérielle fluctuante, tachycardie ou tachypnée). Le diagnostic du syndrome repose sur la présence simultanée d'au moins trois de ces symptômes. Une hyperthermie maligne, une rhabdomyolyse et une insuffisance rénale peuvent compliquer le syndrome sérotoninergique. La mortalité est d'environ 10 %.

Le traitement de ces intoxications repose sur la décontamination gastro-intestinale précoce et sur l'administration éventuelle de différents médicaments permettant de réduire le syndrome sérotoninergique : il s'agit notamment de myorelaxants (clonazépam) et du dantrolène (Dantrium®) pour lutter contre l'hyperthermie maligne. Il est nécessaire également de corriger la déshydratation.

Les inhibiteurs non sélectifs de la sérotonine et de la noradrénaline regroupent le milnacipran (Ixel®) et la venlafaxine (Effexor®). L'intoxication aiguë par ces deux antidépresseurs est généralement d'évolution favorable ; elle se manifeste par une altération de la conscience, des convulsions (venlafaxine) et des troubles digestifs (minalcipran). L'association avec d'autres médicaments renforçant la transmission sérotoninergique peut être à l'origine d'un syndrome sérotoninergique.

IV. Toxicité des inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO)

Cette famille d'antidépresseurs est composée d'un IMAO non sélectif et irréversible, l'iproniazide (Marsilid®) et d'un IMAO sélectif de la mono-oxydase de type A et réversible, le moclobémide (Moclamine®) (*fig.* 4). La toloxatone (Humoryl®) est un second IMAO sélectif et réversible retiré du marché en 2002. Il existe également un IMAO de type de B (sélégiline) utilisé dans la maladie de Parkinson. Ces antidépresseurs sont sans effet stabilisant de membrane.

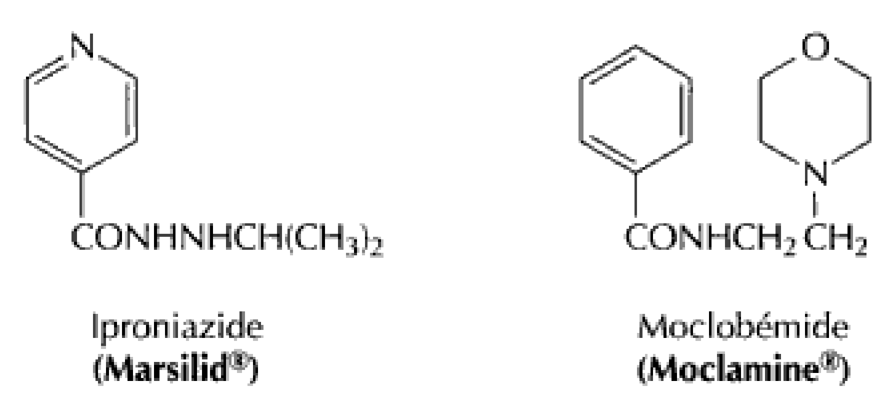


Figure 4. Structure chimique des IMAO

L'intoxication aiguë par l'iproniazide est grave : elle peut se manifester par des troubles du système nerveux central (hallucinations, agitation, coma, convulsions), des troubles cardiovasculaires (tachycardie, hypo- ou hypertension), des troubles de l'hémostase et métaboliques (rhabdomyolyse). La mortalité de cette intoxication est de l'ordre de 30 %. Ce médicament est aujourd'hui peu utilisé et a été remplacé par le moclobémide, qui est moins dangereux.
L'intoxication pure par cet IMAO sélectif et réversible est généralement bénigne et ne s'observe que pour des doses supérieures à 2-3 g chez l'adulte. La symptomatologie est surtout dominée par une altération de l'état de conscience pouvant aller jusqu'au coma et des symptômes cardiovasculaires (hypertension, tachycardie). Lors d'ingestion massive (> 6 g), une hyperthermie et une rigidité musculaire peuvent survenir. La gravité de cette intoxication résulte de l'association du moclobémide avec d'autres antidépresseurs tels que les ADT ou les ISRS, même si ceux-ci sont à doses thérapeutiques. Dans ces cas de polyconsommation, un syndrome sérotoninergique sévère peut compliquer l'intoxication.

V. Toxicité des antidépresseurs non imipraminiques, non IMAO et non ISRS

Cette dernière classe d'antidépresseurs regroupe la miansérine (Athymil®), la mirtazapine (Norset®) et la tianeptine (Stablon®) (*fig. 5*). Les intoxications aiguës pures par l'un de ces antidépresseurs sont généralement bénignes. L'ingestion massive de miansérine entraîne le plus souvent un coma et un syndrome anticholinergique. Les intoxications avec la mirtazapine ou la tianeptine se manifestent par des troubles de la conscience, des troubles digestifs et des troubles cardiovasculaires, le plus souvent mineurs.

CH_3 N N

Miansérine (**Athymil®**)

O O CH_3 S N $NH(CH_2)_6COOH$

Tianeptine (**Stablon®**)

Figure 5. Structure chimique d'antidépresseurs non ADT, non ISRS et non IMAO

L'essentiel de la question

Les intoxications par les ADT sont fréquentes et souvent sévères, surtout chez l'enfant. Elles entraînent un coma assez bref mais accompagné de convulsions et surtout de manifestations cardiovasculaires en relation avec un effet stabilisant de membrane : l'ingestion massive d'ADT peut entraîner des troubles importants de la conduction intraventriculaire et une insuffisance circulatoire d'origine cardiogénique et/ou vasoplégique qui font la gravité de l'intoxication. Le tableau neurologique peut être modifié par des toxiques associés, l'association la plus dangereuse étant celle avec les IMAO ou les ISRS. La prise en charge de l'intoxication aiguë par les ADT est avant tout symptomatique : traitement des convulsions par une benzodiazépine et traitement spécifique des troubles de la conduction intraventriculaire par des solutions molaires de sels de sodium. Les antidépresseurs non tricycliques, tels que les ISRS et les IMAO sélectifs, ont généralement une meilleure tolérance et une moindre toxicité. Toutefois, l'association de ces antidépresseurs entre eux ou avec les ADT, accroît le risque de survenue d'un syndrome sérotoninergique grave.

Pour en savoir plus

- Bismuth C., Baud F.-J., Conso F., Dally S., Frejaville J.-P., Garnier R., Jaeger A. *Toxicologie clinique*, 5e éd. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2000.
- *Bon usage des antidépresseurs au cours des troubles dépressifs chez l'adulte*. Afssaps, avril 2005.
- Zetlaoui P., Lenoble M. *Intoxications aux urgences*. Paris, Elsevier, 2004.
- Kerr G.W., McGuffie A.C., Wilkie S. Tricyclic antidepressant overdose : a review. *Emerg Med J* 2001 ; 18 : 236-41.
- Odou P., Robert H. Traitement de la dépression. Pharmacie clinique et thérapeutique, 2e éd., Masson, 2002 : 799-822.
- Mégarbane B., Delahaye A. Syndrome sérotoninergique et intoxication par les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et les antidépresseurs inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO). http://www.orpha.net, mars 2003.

Toxicologie des benzodiazépines et des carbamates

L. VERNHET, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, université Rennes-I.

Les médicaments psychotropes à propriétés anxiolytiques et/ou hypnotiques sont les plus prescrits dans les pays occidentaux et leur vente est 2 à 3 fois plus importante en France que dans la plupart des autres pays industrialisés. 12 % des hommes et 20 % des femmes de la population française adulte consomment occasionnellement ces médicaments (au moins une fois par an) et environ 6 % sont des consommateurs réguliers (au moins un usage par semaine). *Parmi ces médicaments psychotropes, les benzodiazépines, qui ont progressivement remplacé les barbituriques et les carbamates depuis les années 70, sont les médicaments les plus utilisés pour leurs activités tranquillisante et/ou sédative.* Les carbamates sont aujourd'hui des tranquillisants mineurs qui sont retrouvés, le plus souvent, dans le cadre d'intoxications poly-médicamenteuses.

I. Benzodiazépines

A. Introduction

Les benzodiazépines font partie des substances les plus consommées lors d'intoxications volontaires médicamenteuses. Du fait de leur faible coût et de leur facilité d'obtention, les benzodiazépines sont aussi les médicaments les plus fréquemment détournés par les toxicomanes (*tab. 1*).

Tableau 1. Principales molécules

DC	Spécialités®
Benzodiazépines	
Nitrazépam	Mogadon
Estazolam	Nuctalon
Flunitrazépam	Rohypnol
Loprazolam	Havlane
Lormétazépam	Noctamide
Témazépam	Normison
Triazolam	Halcion
Clotiazépam	Vératran
Oxazépam	Séresta
Alprazolam	Xanax
Lorazépam	Témesta
Bromazépam	Lexomil
Diazépam	Valium
Clorazépate	Tranxène
Clobazam	Urbanyl
Prazépam	Lysanxia
Nordazépam	Nordaz
Loflazépate	Victan
Tétrazépam	Myolastan
Clonazépam	Rivotril
Substances apparentées	
Zolpidem	Stilnox
Zopiclone	Imovane

B. Classification chimique

Les benzodiazépines représentent un groupe de médicaments homogène sur un plan structural (*fig. 1*). La majorité des molécules sont des 1-4 benzodiazépines dont le chef de file est le chlordiazépoxide, commercialisé en France depuis le début des années 1960. Les 1-4 benzodiazépines peuvent être classées selon les différentes substitutions du cycle A en dérivés possédant :

- une fonction cétone en position 2 (diazépam, oxazépam, témazépam, lorazépam, lormétazépam, loflazépate d'éthyle, nitrazépam, flunitrazépam, clonazépam, bromazépam et tétrazépam) ;

1-4 benzodiazépine et ses principaux sites de substitution

Chlordiazépoxide

Diazépam

Clorazépate

Triazolam

Figure 1. Structures de quelques 1-4 benzodiazépines

- une fonction hydroxyle en position 2 (clorazépate dipotassique) ;
- ou un cycle supplémentaire à deux atomes d'azote (triazolam, midazolam, alprazolam, estazolam).

Le zolpidem et la zopiclone sont deux molécules proches de la famille des benzodiazépines sur le plan pharmacologique mais de structures chimiques différentes.

C. Propriétés pharmacologiques et mécanisme d'action

Les benzodiazépines présentent, à des degrés divers, des propriétés anxiolytiques, hypnotiques, anticonvulsivantes et myorelaxantes. Cependant, la structure chimique et les propriétés pharmacocinétiques de ces différentes molécules déterminent généralement leur usage thérapeutique. Ainsi certaines benzodiazépines sont-elles le plus souvent prescrites comme hypnotiques (triazolam, témazépam, loprazolam, flunitrazépam, estazolam, nitrazépam), comme anxiolytiques (loflazépate, nordazépam, prazépam, clobazam, clorazépate, bromazépam, lorazépam, alprazolam, oxazépam, clotiazépam) ou comme anticonvulsivants (diazépam, clonazépam). Le tétrazépam est utilisé comme myorelaxant. Le zolpidem et la zopiclone possèdent une activité hypnotique, des effets myorelaxants et anticonvulsivants ne survenant qu'à des doses très élevées.

Les propriétés pharmacologiques des benzodiazépines résultent de la régulation allostérique du récepteur à l'acide γ-aminobutyrique ou GABA, principal neuromédiateur inhibiteur du système nerveux central. Les benzodiazépines interagissent avec des sites spécifiques de haute affinité localisés sur le complexe macromoléculaire portant les récepteurs de type GABA-A. Cette interaction augmente l'affinité des récepteurs GABA pour le GABA et renforce secondairement l'hyperpolarisation cellulaire. La zoplicone et le zolpidem se lient également avec les récepteurs aux benzodiazépines.

D. Toxicocinétique

1. Absorption et distribution

La résorption des benzodiazépines est généralement rapide et complète par voie orale, variable par voie rectale et lente par voie intramusculaire. Par voie orale, le pic plasmatique est atteint rapidement en 1 heure pour la grande majorité des molécules hypnotiques et en 2 à 4 heures pour celles à visée tranquillisante (*tab.* 2). Les benzodiazépines étant des molécules très liposolubles, leur distribution tissulaire est importante. Ces médicaments traversent la barrière hémato-encéphalique ainsi que la barrière placentaire. Leur fixation aux protéines est toujours élevée et supérieure à 80 %. La demi-vie d'élimination à dose pharmacologique est très variable selon les benzodiazépines, parfois très courte (quelques heures) ou très longue (jusqu'à 60 heures pour le diazépam et le nordazépam). Les demi-vies des benzodiazépines sont augmentées lors d'une intoxication aiguë.

Tableau 2. Données toxicocinétiques de quelques benzodiazépines et substances apparentées

DC	Pic plasm.	Doses tox.	Tx thérap.	Tx tox.	Classe
Alprazolam	2 h	20 à 60 mg	0,002-0,06	0,1-0,4	Anxiolytique
Clobazam	3 à 4 h	200 mg	0,1-0,4	5	Anxiolytique
Clonazépam	3 à 12 h	10 mg	0,03-0,06	0,1-0,12	Anti-convul.
Clorazépate	1 h	500 mg	0,25-0,8 (b)	2	Anxiolytique
Chlordiazépoxide	3 h	500 mg	0,7-2	3,5-10	Anxiolytique
Flunitrazépam	1 à 2 h	10 mg	0,005-0,015	0,05	Hypnotique
Lorazépam	2 h	100 mg	0,02-0,25	0,3-0,6	Hypnotique
Nitrazépam	2 h	100 mg	0,03-0,12	0,2-0,5	Hypnotique
Prazépam	4 h	500 mg	0,2-0,8 (a)	1,1-2	Anxiolytique
Triazolam	30' à 1 h	5 mg	0,002-0,02	0,04	Hypnotique
Zolpidem	1 h	200 mg	0,08-0,15	0,5	Hypnotique
Zopiclone	1 h	100 mg	0,01-0,05	0,15	Hypnotique

DC : dénomination commune ; Pic plasm. : pic plasmatique ; Doses tox. : doses toxiques ; Tx thérap. : taux sanguins thérapeutiques (mg/L) ; Tx tox. : taux sanguins toxiques (mg/L) ; Anticonvul. : anticonvulsivant ; (a) : prazépam + nordazépam ; (b) : clorazépate + nordazépam.

2. Métabolisme et élimination

Les benzodiazépines sont biotransformées au niveau hépatique par les systèmes à mono-oxygénase de type cytochrome P450 (tel que le CYP3A4) puis glucuruno-conjuguées. Le métabolisme oxydatif consiste principalement en des réactions de

- N-déalkylation de l'azote en position 1 ;
- hydroxylation du carbone en position 3 ;
- réduction de groupements nitrés en groupements aminés suivie de leur acétylation ;
- ouverture par hydrolyse du cycle B.

Ces voies de biotransformation peuvent former des métabolites communs à différentes benzodiazépines et pharmacologiquement actifs. C'est par exemple le cas du N-déméthyl-diazépam, qui est issu du métabolisme du diazépam, du témazépam, du chlordiazépoxide, du clorazépate dipotassique et du prazépam.
Les différents composés issus de la biotransformation des benzodiazépines sont excrétés principalement par voie urinaire mais aussi par voie biliaire.

E. Intoxications aiguës

Les doses toxiques chez l'adulte sont variables et s'échelonnent approximativement de 5 à 500 mg. La toxicité des benzodiazépines dépend principalement de la molécule considérée (le triazolam étant certainement l'une des molécules les plus dangereuses), de l'âge du consommateur, de sa tolérance éventuelle lors d'une consommation régulière et de l'existence ou non de certaines pathologies. Chez l'enfant, les doses toxiques exprimées en mg/kg correspondent approximativement au centième de la dose toxique adulte.

L'intensité de la symptomatologie est généralement liée au délai d'apparition du pic de concentration plasmatique de la benzodiazépine consommée. Plus le pic plasmatique apparaît précocement et plus la symptomatologie est intense. Cela concerne particulièrement les benzodiazépines de type hypnotique telles que le triazolam et le flunitrazépam et les molécules benzodiazépine-like telles que le zolpidem et la zopiclone. En revanche, la symptomatologie de l'intoxication est moins intense et plus étalée dans le temps lorsque le pic plasmatique est plus tardif. Ce profil toxicocinétique correspond généralement aux benzodiazépines de type anxiolytique qui sont résorbées plus lentement par le tractus digestif.
La symptomatologie résulte d'une exacerbation des propriétés pharmacologiques des benzodiazépines sur le système nerveux central. Elle se caractérise fréquemment dans un premier temps par l'apparition de troubles du comportement (obnubilation, agitation), puis, dans un second temps, par une dépression du système nerveux central se manifestant par une somnolence, une hypotonie musculaire ou un coma rarement très profond. La dépression respiratoire est peu fréquente et généralement modérée lorsque l'intoxication est mono-médicamenteuse. Enfin des troubles cardiovasculaires mineurs tels qu'une hyperexcitabilité sinusale ou une hypotension modérée peuvent être observées, notamment avec les benzodiazépines de type hypnotique.
Le pronostic est généralement favorable, le décès demeurant très exceptionnel. Cependant, certaines circonstances favorisent l'apparition ou l'aggravation de la dépression respiratoire et compliquent donc l'évolution de l'intoxication. Ce sont les insuffisances rénale, hépatique ou surtout respiratoire, l'ingestion de doses massives de benzodiazépines ou encore l'association des benzodiazépines avec de l'alcool ou d'autres médicaments déprimant le système nerveux central (morphinomimétiques, antidépresseurs, barbituriques). Dans ce cas, les benzodiazépines potentialisent la dépression respiratoire et favorisent la survenue d'un décès.

F. Effets paradoxaux et amnésiques

Chez certaines personnes, les benzodiazépines peuvent déclencher un comportement agressif, une levée d'inhibition ou un syndrome confusionnel, des effets mnésiques de type antérograde allant de quelques minutes à plusieurs heures. Ces manifestations concernent essentiellement le triazolam, le flunitrazépam et le lorazépam, et sont renforcées par l'ingestion simultanée d'alcool. Ces propriétés d'ordre psychopharmacologique ont entraîné un détournement de l'usage du flunitrazépam (Rohypnol®), en particulier pour des tentatives d'agression sexuelle avec « soumission médicamenteuse ». Le flunitrazépam est alors administré à la victime, à son insu, associé à une boisson alcoolisée.

G. Dépendance et toxicomanie

Les benzodiazépines entraînent une tolérance, une dépendance physique et psychique lors d'un traitement prolongé. L'arrêt brutal du traitement peut déclencher un véritable syndrome de sevrage marqué par une recrudescence des troubles du sommeil, de l'anxiété, et l'apparition de tremblements, de douleurs musculaires et

parfois d'hallucinations visuelles. La prévention du syndrome de sevrage nécessite le plus souvent une réduction très progressive de la posologie, en particulier lorsque le traitement a duré plusieurs mois. Les benzodiazépines sont également fréquemment utilisées par les toxicomanes dans le cadre de polyconsommations.

H. Traitement de l'intoxication aiguë

1. Mesures générales

La nature de ce traitement dépend d'une part de la précocité de la prise en charge du patient et d'autre part de la sévérité de l'intoxication. Le traitement peut tout d'abord reposer sur l'évacuation du toxique par des lavages gastriques et sur l'administration de charbon actif afin de limiter l'absorption digestive des benzodiazépines. Cependant ce type traitement doit être entrepris suffisamment tôt après l'ingestion des benzodiazépines pour être réellement efficace ce qui s'avère difficile avec des molécules de types hypnotiques telles que le triazolam. Le traitement est donc principalement symptomatique et consiste en une surveillance neurologique et cardio-respiratoire. En particulier, une réanimation respiratoire (intubation et la ventilation assistée) peut être nécessaire en cas de coma profond. Enfin la troisième composante du traitement de l'intoxication aiguë repose sur l'administration d'un antidote spécifique, le flumazénil.

2. Administration de flumazénil (Anexate®)

Le flumazénil est un antagoniste pur des récepteurs aux benzodiazépines et ne possède donc pas d'activité intrinsèque. Il déplace les benzodiazépines mais aussi le zolpidem et la zopiclone de leurs récepteurs de façon compétitive. Le flumazénil est une imidazo-benzodiazépine d'action très rapide, agissant 30 à 60 secondes après une injection intraveineuse. Le flumazénil, qui est biotransformé au niveau hépatique en acide carboxylique inactif, a une demi-vie très courte d'environ 30 minutes.

L'administration de flumazénil lors d'une intoxication aiguë permet d'éviter l'intubation et la ventilation respiratoire, notamment chez les personnes âgées ou présentant une insuffisance respiratoire. Le flumazénil, qui est réservé à l'usage hospitalier, se présente en ampoules de 10 mL et de 5 ml contenant respectivement 1 mg et 0,5 mg. Cet antidote est administré soit par voie intraveineuse lente (15 secondes environ) à des doses de 0,1 à 0,2 mg sans dépasser 1 mg, soit en perfusion continue de 0,5 à 1 mg/h. Dans le cas de l'administration discontinue, la dose d'entretien à administrer par heure correspond à la dose de charge ayant amélioré l'état du patient.

Les effets secondaires propres au traitement par le flumazénil sont limités à des troubles digestifs (nausées, vomissements), à des sensations d'angoisse et à des palpitations lors d'injections trop rapides. Cependant, le flumazénil favorise le déclenchement de convulsions dans les situations d'intoxications polymédimenteuses, notamment lors de l'association de benzodiazépines avec des antidépresseurs tricycliques. Les convulsions pouvant survenir rapidement au décours de

l'injection de flumazénil, l'utilisation de cet antagoniste lors de la recherche d'une étiologie de coma inexpliqué n'est pas sans risque. Enfin, le flumazénil peut déclencher un syndrome de sevrage chez les consommateurs réguliers de benzodiazépines à doses élevées. L'utilisation de flumazénil est contre-indiquée en cas d'hypersensibilité connue au flumazénil ou aux benzodiazépines, et nécessite la plus grande prudence chez les patients épileptiques.

I. Toxicologie analytique

Les benzodiazépines sont des bases faibles à l'exception du chlordiazépoxide (base forte). Elles sont solubles dans de nombreux solvants organiques et dans l'eau en milieu acide. Les sels sont solubles dans l'eau. Les benzodiazépines absorbent dans l'UV avec en général deux maximums d'absorption à 240 nm et 285 nm en milieu chlorhydrique concentré (2 N).
L'analyse des benzodiazépines dans les milieux biologiques nécessite dans un premier temps une recherche rapide dans les urines par une méthode immunologique, puis dans un second temps une identification par une méthode chromatographique couplée ou non à la spectrométrie de masse. Les benzodiazépines détectées dans les urines sont également recherchées et quantifiées dans un échantillon sanguin.

1. Méthodes immunologiques

Il existe aujourd'hui de nombreuses techniques immunologiques utilisées pour le dépistage des benzodiazépines dans les milieux biologiques tels que le sang et les urines. La technique FPIA (Fluorescence Polarisation Immuno Assay) est une méthode particulièrement utilisée au sein des laboratoires d'urgence pour sa rapidité d'exécution, ne nécessitant pas de prétraitement des échantillons, et pour sa facilité d'utilisation. Elle a une bonne sensibilité (40 ng/mL) mais une moins bonne spécificité que les méthodes chromatographiques. Les techniques immunologiques ne permettent donc pas d'obtenir des résultats quantitatifs précis et ne réalisent qu'un dépistage de classe.

2. Méthodes chromatographiques

La chromatographie des benzodiazépines nécessite d'une part une conservation appropriée des échantillons biologiques et d'autre part une étape de préparation pour l'analyse. Les échantillons peuvent se conserver de façon transitoire à 4 °C et à l'abri de la lumière mais il est impératif de les stocker à – 20 °C pour des délais de plusieurs semaines ou mois. Différents facteurs peuvent en effet influencer la stabilité des benzodiazépines. Ce sont la dégradation photochimique, la dégradation thermique concernant notamment le nitrazépam, le lorazépam, l'oxazépam ou le chlordiazépoxide, et la dégradation en milieu acide ou alcalin, qui favorise l'hydrolyse des benzodiazépines et l'ouverture du cycle à proximité des atomes d'azote en 1-2 et 4-5. La libération des métabolites de leurs formes conjuguées est réalisée par une hydrolyse enzymatique à l'aide de β-glucuronidase. La chromatographie est réalisée après l'extraction des benzodiazépines des liquides biologiques, par extraction liquide-liquide ou par extraction en phase solide. L'extraction liquide est le

plus souvent menée à pH 9-9,5, de façon à amener les benzodiazépines sous forme non ionisée. La nature du solvant organique utilisé est variable : dichlorométhane, acétate d'éthyle, heptane, hexane… L'extraction en phase solide est réalisée sur des colonnes à base de silice greffées de notamment de type octadécyle (C18).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont deux méthodes analytiques majeures pour le dosage des benzodiazépines. En CPG, le chromatographe peut être équipé d'une colonne de type 5 % phénylmethylsilicone et couplé à différents types de détecteurs : capture d'électrons (ECD), détecteur azote-phosphore (NPD), spectromètre de masse (MS). La sensibilité est de l'ordre de 0,1 à 1 ng/mL. Plusieurs benzodiazépines étant thermolabiles, une dérivation des composés à analyser (formation de dérivés méthylés ou silylés, par exemple) s'avère nécessaire pour éviter leur décomposition lors de la chromatographie.

La CLHP est une seconde méthode de choix pour les benzodiazépines, en particulier pour les substances thermiquement instables qui peuvent être analysées sans la dérivation inhérente à la CPG. En CLHP, les benzodiazépines sont le plus souvent chromatographiées sur une colonne à polarité inversée de type C18, en utilisant une phase mobile polaire composée d'eau ou d'un tampon (phosphate ou acétate) mélangée à du méthanol et/ou de l'acétonitrile. La spectrophotométrie UV est le mode de détection le plus fréquemment utilisé ; les détecteurs à barrette de diodes permettent aujourd'hui d'identifier et de quantifier les différentes benzodiazépines. La sensibilité est de l'ordre de 0,5 à 50 ng/mL. Le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse est une méthode alternative permettant la détection de benzodiazépines thermolabiles et dont la sensibilité avoisine 1 ng/mL.

3. Interprétation des résultats

L'interprétation des dosages sanguins est souvent délicate pour différentes raisons. D'une part, les concentrations toxiques sont variables selon la nature des benzodiazépines étudiées ; d'autre part, ces concentrations ne sont pas toujours corrélées à la symptomatologie de l'intoxication. Enfin, pour de nombreuses benzodiazépines, il est nécessaire de rechercher et de prendre en compte la concentration de leurs différents métabolites actifs.

II. Carbamates

A. Introduction

Les carbamates représentent une grande famille de substances utilisées principalement dans le domaine de l'agriculture comme pesticides et dans le domaine de la santé comme anxiolytiques et/ou hypnotiques. Les carbamates, en tant que pesticides, sont caractérisés par des propriétés anticholinestérasiques réversibles. Ces produits augmentent donc la transmission cholinergique et entraînent des effets parasympathomimétiques chez l'homme. Nous n'aborderons pas la toxicologie de

ces substances et nous nous limiterons à une synthèse des effets toxiques des carbamates ayant un usage strictement thérapeutique.
Les carbamates ont été largement prescrits dans les années 1960 pour leurs propriétés tranquillisantes et sédatives. Cependant, ces substances se sont avérées toxiques, et l'émergence des benzodiazépines a considérablement réduit leur usage thérapeutique. Actuellement, seul le méprobamate, un ester de l'acide carbamique, est encore commercialisé en France comme anxiolytique/hypnotique (Équanil®).

B. Mécanisme d'action et toxicocinétique

Comme les benzodiazépines et les barbituriques, les carbamates renforcent la transmission GABAergique et favorisent donc à doses toxiques la dépression du système nerveux central.
L'absorption digestive du méprobamate est bonne et rapide, le pic plasmatique apparaissant en 1 à 3 heures. Toutefois, lors d'une prise massive, l'absorption digestive des carbamates est fortement ralentie et des agglomérats de comprimés peuvent persister de nombreuses heures dans l'estomac. Cela entraîne un allongement de la demi-vie plasmatique des carbamates qui est, aux posologies thérapeutiques, d'environ 10 heures. La fixation aux protéines plasmatiques est faible, de l'ordre de 20 %. Le méprobamate est biotransformé au niveau hépatique, principalement en métabolite hydroxylé puis glucuronoconjugué. L'élimination des métabolites se fait par voie rénale.

C. Intoxication aiguë

Les intoxications aiguës par les carbamates représentent environ 5 % des intoxications par les médicaments psychotropes, et 80 % des cas sont des intoxications polymédicamenteuses. Les doses toxiques sont supérieures à 4 g chez l'adulte et à 50 mg/kg chez l'enfant. L'intoxication aiguë se manifeste dans un premier temps par une exacerbation des propriétés pharmacologiques puis dans un second temps par une dépression du système nerveux central pouvant déboucher sur un coma de type barbiturique. Le coma, apparaissant pour des concentrations plasmatiques supérieures à 100 mg/L, est calme, de longue durée (24 à 72 heures), hypotonique et parfois hypothermique. Pour des concentrations plasmatiques plus élevées (> 200 mg/L), des troubles hémodynamiques graves peuvent être associés. À ces concentrations, la gravité de l'intoxication résulte de la survenue d'une insuffisance circulatoire aiguë dont le mécanisme dépend de la dose. À faible dose, les carbamates peuvent induire une hypovolémie vraie, alors qu'à fortes doses ils provoquent une insuffisance myocardique par toxicité cardiaque.

D. Dépendance

Les traitements de longue durée par les carbamates entraînent une dépendance physique et psychique. L'arrêt brutal du traitement peut déclencher un syndrome de sevrage. Comme pour les benzodiazépines anxiolytiques, la prescription des carbamates est donc limitée à 12 semaines maximum.

E. Traitement de l'intoxication aiguë

Le traitement repose d'une part sur une thérapeutique symptomatique et d'autre part sur une thérapeutique d'épuration. La composante symptomatique du traitement consiste à mettre en œuvre une réanimation respiratoire (intubation et ventilation assistée) et à traiter les troubles hémodynamiques selon leurs origines. Le traitement épurateur repose sur la mise en œuvre de lavages gastriques réalisables jusqu'à la 12e heure. L'administration de charbon activé n'augmente pas l'élimination des carbamates. Les traitements d'épuration extrarénale n'ont pas démontré d'efficacité lors d'intoxication grave.

F. Toxicologie analytique

Les carbamates sont recherchés dans les milieux biologiques après extraction par un solvant organique (éther, dichlorométhane ou acétate d'éthyle) en milieu neutre ou alcalin. Leur caractérisation peut être réalisée par colorimétrie avec le paradiméthyla-minobenzaldéhyde en présence de chlorure d'aluminium anhydre. Leur identification est classiquement faite par chromatographie sur couche mince. Le dosage dans le plasma ou le sérum s'effectue, après extraction par le chloroforme en milieu basique et concentration de l'extrait organique, par CPG. Les taux sériques thérapeutiques du méprobamate se situent autour de 25 mg/L alors que les taux toxiques s'observent à partir de 50 mg/L.

L'essentiel de la question

Les benzodiazépines sont parmi les médicaments les plus consommés dans les pays industrialisés occidentaux. Ce sont des médicaments psychotropes utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés anxiolytiques, hypnotiques, myorelaxantes et anticonvulsivantes. Les benzodiazépines agissent en potentialisant la transmission de l'acide gamma-aminobutyrique ou GABA, principal neuromédiateur inhibiteur du système nerveux central. Les benzodiazépines sont absorbées en 1 à 3 heures par voie orale, biotransformées au niveau hépatique en métabolites actifs ou inactifs et éliminés principalement par voie urinaire. Une très large prescription médicale des benzodiazépines a favorisé d'une part l'augmentation des intoxications aiguës volontaires chez l'adulte, qui représentent actuellement 60 à 70 % des intoxications médicamenteuses, et d'autre part un détournement de leur usage par les toxicomanes. La symptomatologie des intoxications aiguës monomédicamenteuses se limite généralement à des troubles du comportement puis à une dépression modérée du système nerveux central. L'évolution est le plus souvent spontanément favorable et les décès sont très rares. En revanche, l'intoxication aiguë polymédicamenteuse associant benzodiazépines, alcool ou d'autres médicaments déprimant le système nerveux central est de plus mauvais pronostic. En effet, dans ces conditions d'intoxication, les benzodiazépines favorisent l'apparition ou l'aggravation d'une dépression respiratoire et/ou d'un coma. Le traitement de l'intoxication aiguë repose principalement sur une surveillance neurologique et cardiovasculaire et sur l'administration de flumazénil, l'antagoniste spécifique des benzodiazépines. Le flumazénil, d'action

très rapide, est utilisé pour éviter une réanimation respiratoire, notamment chez les personnes âgées ou souffrant d'insuffisance respiratoire. La toxicologie analytique des benzodiazépines nécessite d'une part leur recherche dans les urines par des méthodes immunologiques simples et rapides et d'autre part leur détermination et leur quantification par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie haute performance, couplées éventuellement à la spectrométrie de masse.
Les carbamates sont des médicaments anxiolytiques et hypnotiques, dont l'usage thérapeutique a nettement régressé depuis la commercialisation des benzodiazépines. Le méprobamate, principal représentant de cette classe médicamenteuse, renforce comme les barbituriques et les benzodiazépines la transmission GABAergique. À doses toxiques, il provoque un coma profond et durable de type barbiturique et déclenche des troubles hémodynamiques parfois sévères. Le traitement de l'intoxication aiguë est principalement épurateur et symptomatique.

Pour en savoir plus

- Bismuth C., Baud F.-J., Conso F., Dally S., Frejaville J.-P., Garnier R., Jaeger A. *Toxicologie clinique*, 5[e] éd. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2000.
- Zetlaoui P., Lenoble M. *Intoxications aux urgences*. Paris, Elsevier, 2004.
- Hantson P., Mahieu P. « Conduite à tenir devant des troubles de la conscience d'origine toxique », in Jeager A. et Vale J. A., *Intoxications aiguës*. Paris, Elsevier, 1999 : 96-112.
- Observatoire français des drogues et toxicomanies (OFDT), www.ofdt.fr.

Toxicologie des antalgiques : salicylés et paracétamol

M. LHERMITTE, Laboratoire de toxicologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Lille.
A.-M. BATT[†], Laboratoire de toxicologie, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Nancy.

De nombreux produits analgésiques non morphiniques sont utilisés pour traiter la douleur, la fièvre et l'inflammation. Quelques-uns sont délivrés sans ordonnance. En France, les deux principales substances analgésiques antipyrétiques sont l'aspirine et le paracétamol ; vu leur fréquence d'utilisation, ils arrivent également en tête de cette classe médicamenteuse en ce qui concerne les effets toxiques.

I. Salicylés

A. Introduction

Les salicylés sont surtout représentés par l'aspirine (acide acétylsalicylique), antalgique très usité en France. L'aspirine possède, à faible dose (0,5 g), un effet antiagrégant plaquettaire par inhibition de la formation de thromboxane A2 ; à doses modérées (0,5 à 3 g), elle est analgésique par action sur les voies périphériques de la douleur et antipyrétique par action centrale antagoniste des prostaglandines ; elle exerce une action anti-inflammatoire par blocage de la PG2-H2-synthétase avec inhibition de la cyclo-oxygénase et de l'hydroperoxydase. On rencontre également l'acide salicylique et les salicylates (salicylate de méthyle).

B. Modes d'intoxication

L'ingestion des salicylés représente la voie d'intoxication la plus fréquente. Il s'agit d'intoxications accidentelles de l'enfant de moins de 5 ans (5 %), surtout pour une dose ingérée supérieure à 1,5 g, alors qu'il s'agit de tentatives d'autolyse ou d'abus chronique chez l'adulte (3 à 4 % des patients des unités de soins spécialisés). À partir de 10 à 15 g, l'intoxication reste modérée. Mais elle est particulièrement dramatique pour une dose supérieure à 20 g.
On constate que la sévérité de l'intoxication pour une même dose rapportée au poids est plus grande chez l'enfant que chez l'adulte ; le risque augmente si l'enfant est fébrile et/ou déshydraté. Chez l'enfant, les signes cliniques de l'intoxication apparaissent pour des doses de 150 mg/kg, mais il peut exister un risque dès que la dose quotidienne dépasse 50 mg/kg.
L'application répétée de pommades salicylées sur de grandes surfaces de peau lésée est également une voie d'intoxication accidentelle réelle.
La fréquence des intoxications accidentelles de l'enfant et des ingestions suicidaires de l'adulte a diminué en raison du remplacement progressif de cet antalgique antipyrétique par le paracétamol.

C. Cinétique et métabolisme

Au niveau de l'estomac, l'acide acétylsalicylique (acide faible) et l'acide salicylique sont essentiellement sous forme non ionisée et pénètrent rapidement dans les cellules de la muqueuse. La très large surface d'absorption de l'intestin grêle explique également la bonne absorption à ce niveau. Avant d'atteindre la circulation générale, une fraction de l'acide acétylsalicylique est hydrolysée en acide salicylique par des estérases digestives.

La présence d'aliments dans l'estomac diminue la vitesse d'absorption. À forte dose, l'acide acétylsalicylique ralentit la vidange gastrique, ce qui a pour effet d'augmenter la durée de sa résorption. Le délai d'apparition du pic plasmatique varie entre 30 minutes (formes solubles) et 6 heures (forme à délitement entérique). Lors d'un surdosage massif, il peut se situer 12 heures après l'ingestion.
L'absorption est également possible par voie percutanée et rectale.
Le pourcentage de fixation de l'acide salicylique dépend des concentrations plasmatiques. Quand elles sont comprises entre 100 et 200 mg/L, 80 à 95 % sont fixés sur l'albumine. Ce pourcentage descend à 50 % pour des concentrations supérieures à 400 mg/L. Plus les concentrations plasmatiques en acide salicylique sont élevées, plus le pourcentage de forme libre diffusible dans les tissus augmente. En cas d'hypoalbuminémie, la toxicité augmente.
L'acide salicylique diffuse dans tous les liquides de l'organisme, et on retrouve des concentrations importantes dans les organes richement vascularisés (reins, foie, cœur, poumons, cerveau). Lors d'usage prolongé, les tissus se saturent, et on peut constater des augmentations importantes au niveau des concentrations plasmatiques. Lorsque la dose augmente de 50 mg/kg, les taux sanguins augmentent de 300 %.
Les salicylés traversent lentement la barrière hématoméningée, parce que la forme ionisée est prédominante ; cependant, l'acidose favorise la forme non ionisée, ce qui augmente le volume de distribution (en thérapeutique : 0,15 à 0,2 L/kg, lors de surdosage, il peut atteindre 0,6 L/kg) et facilite la pénétration des salicylés dans le système nerveux central. L'acide salicylique diffuse dans l'unité fœtoplacentaire. On peut en retrouver dans le lait maternel.
À dose thérapeutique, la demi-vie plasmatique est de 2 heures à 4 h 30 ; en cas de surdosage, elle peut atteindre 36 heures.
L'acide salicylique est métabolisé principalement au niveau hépatique par conjugaison avec le glycocolle et l'acide glucuronique. Les deux systèmes de conjugaison sont saturables. Il peut être également hydroxylé en acide gentisique (métabolite actif, inhibiteur de la synthèse des prostaglandines) (*fig. 1*).
À dose toxique, la proportion d'acide salicylique libre directement éliminée par le rein augmente. Son élimination rénale se fait par filtration glomérulaire et réabsorption tubulaire. La réabsorption tubulaire de cet acide (faible) dépend du pH, elle est faible à un pH supérieur à 6, pH auquel l'acide salicylique est ionisé, ce qui empêche sa réabsorption.

D. Mécanisme de toxicité des salicylés

Les mécanismes par lesquels les salicylés lèsent la muqueuse gastrique sont complexes : un effet irritant local de l'ion salicylé, lésant les capillaires sous-muqueux avec nécrose secondaire et saignement, mais aussi augmentation de la sécrétion acide, liée à l'inhibition systémique de la synthèse des prostaglandines. Cette toxicité sur la muqueuse gastrique se retrouve, même à faible dose. Au cours des intoxications, les lésions de gastrite hémorragique, constantes et précoces sont expliquées par l'action anticoagulante par diminution de l'adhésivité plaquettaire de l'aspirine.

Glucuronide ($O-C_6H_9O_6$) ← Acide salicylique → Glucuronide ($CO-O-C_6H_9O_6$, OH)

Acide acétyl salicylique ($COOH$, $O-CO-CH_3$) → Acide salicylique ($COOH$, OH)

Acide salicylique → Acide gentisique (OH, COOH, OH) ; Acide salicylique → Acide salycylurique ($CO-NH-CH_2-COOH$, OH)

Figure 1. Métabolisme de l'acide acétylsalicylique

La physiopathologie de la toxicité des salicylés peut s'expliquer par une stimulation du système nerveux central (SNC) et une intervention sur la phosphorylation oxydative au niveau du système transporteur d'électrons (*fig. 2*).

Le centre de la respiration est stimulé par deux mécanismes : une stimulation directe par les salicylés et indirectement par une augmentation de la pCO_2. Les salicylés augmentent la consommation en O_2 en augmentant le métabolisme cellulaire. Cela provoque une hyperthermie et une accumulation de CO_2, à l'origine d'une hyperpnée. Cette hyperpnée, accompagnée d'une tachypnée, est aussi le résultat de la stimulation du centre respiratoire par les concentrations toxiques de salicylés. La respiration s'accélère donc et une quantité anormale de CO_2 est expirée par les poumons. Le CO_2 plasmatique se trouve diminué.

On sait que le pH sanguin est maintenu selon l'équation :

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

La diminution du CO_2 plasmatique entraîne un déficit en acide carbonique, ayant comme conséquence une diminution de la concentration en ions $[H^+]$.

Le pH sanguin dépend du rapport bicarbonate $[HCO_3^-]$/acide carbonique $[H_2CO_3]$, selon l'équation de Henderson-Hasselbalch :

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

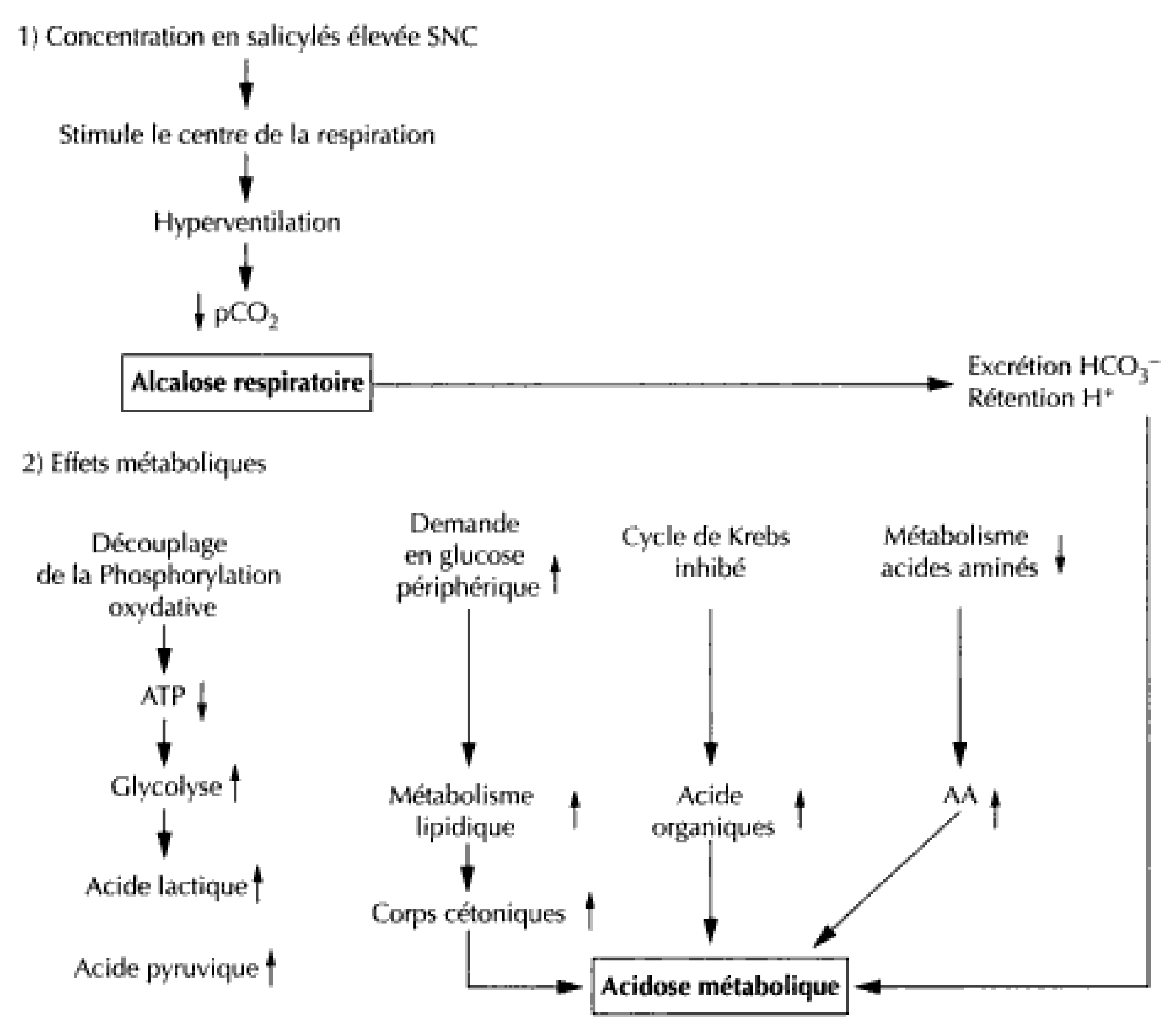


Figure 2. Pathophysiologie de l'intoxication salicylée

Dans les conditions physiologiques, la concentration plasmatique et extracellulaire de HCO_3^- est de 27 mEq/L, celle de l'acide carbonique de 1,35 mEq/L, le pH sanguin, étant fonction du rapport $[HCO_3^-]/[H_2CO_3] = 27 \div 1,35 = 20$, est voisin de 7,4.
Comme la pCO_2 et la concentration en H_2CO_3 diminuent, la concentration en bicarbonate étant la même, le rapport HCO_3^-/H_2CO_3 augmente, provoquant une augmentation du pH sanguin.
Le rein essaye de compenser ce déséquilibre acido-basique, en excrétant plus de bicarbonates et en retenant les ions H^+ et les anions autres que les bicarbonates. Habituellement, ce mécanisme fonctionne pour rétablir le déséquilibre acido-basique et ramener ce rapport vers 20. Dans l'intoxication salicylée, ce phénomène peut s'amplifier ou s'additionner à une acidose métabolique latente (*fig.* 2).
La seconde action de l'intoxication salicylée réside dans le découplage de la phosphorylation oxydative qui, finalement, va produire une acidose métabolique avec un trou anionique élevé (cations dosés – anions dosés). L'acidose métabolique se déroule en plusieurs étapes (*fig.* 2).

- On sait que les mitochondries ont une fonction primordiale qui est la production d'une source d'énergie : l'ATP Les atomes d'hydrogène et les électrons issus de la glycolyse et du cycle de Krebs sont transférés, au moyen d'une série de réactions d'oxydoréduction par la chaîne des cytochromes, à la molécule d'oxygène pour

former de l'eau. Au cours de cette étape, plusieurs molécules d'ATP se forment. Ce processus concernant le transfert d'électrons à des accepteurs et la production d'ATP est appelé « phosphorylation oxydative ».

- Le résultat du découplage consiste en une diminution de la formation d'ATP. Les cellules essayent alors de compenser ce déficit énergétique en augmentant la glycolyse. Mais seulement deux molécules d'ATP sont formées au cours de la glycolyse par phosphorylation. Cette voie métabolique moins énergétique produit de l'acide lactique et de l'acide pyruvique.
- L'organisme peut alors utiliser sa réserve en glycogène pour y puiser de l'énergie. Si les deux sources précédentes d'énergie sont réduites, l'organisme utilise le métabolisme des lipides comme source énergétique. C'est un mécanisme énergétique efficace, mais il conduit à un excès d'acides gras libres dans le foie, provoquant une augmentation des corps cétoniques et, en conséquence, une acidocétose.
- L'intoxication salicylée inhibe les déshydrogénases du cycle de Krebs, provoquant une accumulation d'acide alpha-cétoglutarique et oxaloacétique. Elle inhibe le métabolisme des acides aminés provoquant leur accumulation. Ce résultat contribue à l'acidose métabolique.

Ce découplage de la phosphorylation oxydative conduit donc à l'acidose métabolique avec un trou anionique élevé.
Les autres troubles observés sont une déshydratation souvent globale, intra- et extracellulaire, traduisant les pertes digestives, respiratoires et cutanées.
L'hypoglycémie, observée chez l'enfant, traduit la déplétion du stock de glycogène hépatique : les salicylés inhibent la synthèse du complexe prothrombinique, diminuent l'agrégation plaquettaire.
Une hypokaliémie, résultat d'un transfert intracellulaire à la phase d'alcalose et d'une fuite urinaire, est mise en évidence.

E. Clinique de l'intoxication aiguë

Les signes les plus fréquemment rencontrés dans une intoxication salicylée sont résumés dans le *tableau 1*.
Le symptôme majeur de l'intoxication salicylée est donc l'hyperventilation ; elle associe une augmentation de la fréquence et une augmentation du volume courant que le patient conscient ne peut contrôler. Les troubles respiratoires évoluent donc en trois phases : (i) alcalose respiratoire pure, (ii) alcalose respiratoire avec acidose métabolique, (iii) acidose mixte. À ce stade, l'hyperventilation disparaît.

Tableau 1. Signes cliniques

	Signes et symptômes	Concentration sérique
Toxicité asymptomatique		< 450 mg/L
Toxicité légère	Nausée, gastrite, hyperpnée légère	450-650 mg/L
Toxicité modérée	Hyperpnée, hyperthermie, sueurs, déshydratation, léthargie, excitation possible	650-900 mg/L
Toxicité sévère	Coma, convulsions, cyanose, œdème respiratoire, dépression respiratoire, collapsus cardiovasculaire	900-1 200 mg/L
Toxicité létale	Coma, mort	> 1 200 mg/L

Les autres symptômes associent nausées, vomissements, épigastralgie, hématémèse, fièvre, déshydratation globale, extra- et intracellulaire, insuffisance rénale et baisse du taux de prothrombine.
Selon l'âge, il est fondamental de distinguer deux formes dans l'intoxication :

- chez l'adulte, la conscience est longtemps conservée, les manifestations sensorielles sont intenses : céphalées, vertiges, hypoacousie, bourdonnements d'oreille ; plutôt qu'un coma, il s'agit d'une encéphalopathie ;
- chez le jeune enfant, la conscience est rapidement altérée, les convulsions sont fréquentes. La déshydratation est intense. La phase d'alcalose pure passe souvent inaperçue. L'intoxication est grave pour des surdosages modérés.

Les signes cliniques (coma et hyperpnée) et biologiques (acidocétose et hyperglycémie) peuvent évoquer une acidocétose diabétique qu'il faut confirmer par la recherche de salicylés.
L'intoxication par le salicylate de méthyle provoque les mêmes troubles que l'aspirine, les symptômes sont plus précoces : excitation, hyperpnée et fièvre.
De même, l'intoxication par l'acide salicylique (rare) est similaire à celle de l'aspirine, avec une irritation gastrique plus intense.

F. Pronostic de l'intoxication

L'âge de l'intoxiqué est important : l'enfant de moins de 4 ans fait une intoxication sévère au-delà de 250 mg/kg.
Le taux plasmatique des salicylés est un bon facteur de pronostic : les formes fatales sont celles ayant une salicylémie supérieure à 1 200 mg/L à la 6e heure de l'intoxication.
Les troubles de la conscience, l'apparition de convulsions et l'intensité de l'acidose métabolique sont de bons témoins de gravité.

G. Traitement de l'intoxication

Le traitement comporte l'élimination digestive des salicylés, la correction des troubles métaboliques et l'élimination urinaire des salicylés.
La décontamination digestive doit être entreprise en cas d'intoxication vue précocement, dans le respect des contre-indications. L'utilisation de doses répétées de charbon activé dans l'intoxication salicylée est controversée, dans la mesure où les résultats des études cliniques et expérimentales sont discordants. En conséquence, les données à ce jour sont insuffisantes pour recommander l'utilisation de doses répétées de charbon actif.
Le traitement symptomatique doit être rigoureux. La déshydratation est fréquente dans l'intoxication salicylée. On la corrige par des perfusions de sérum salé isotonique. Il est important que le patient soit réhydraté pour maintenir sa fonction rénale normale, les salicylés étant éliminés par voie rénale. Si la déshydratation intracellulaire est importante, on administre en perfusion du sérum glucosé isotonique, du bicarbonate de sodium pour corriger l'acidose métabolique, dès que la réserve alcaline est inférieure à 20 mmol/L. À mesure que l'on alcalinise, la pCO_2 remonte et une dépression de la vigilance et de l'amplitude respiratoire survient, pouvant imposer l'intubation et l'assistance respiratoire.

On peut ajouter à la perfusion du chlorure de potassium pour corriger l'hypokaliémie et prévenir l'alcalose due à l'administration de bicarbonate de sodium.
L'hyperthermie est traitée par enveloppement humide ou utilisation de glace. L'apport glucosé est fonction de la glycémie.
Le traitement symptomatique fait également appel à l'administration de diazépam pour les convulsions, de calcium pour les états de tétanie et de vitamine K1 pour les troubles de la coagulation.
L'alcalinisation des urines par le bicarbonate accroît l'ionisation des salicylés et diminue leur réabsorption tissulaire, lorsque le pH urinaire est supérieur à 6. Une diurèse alcaline (pH ≈ 7,5) est efficace dans le cas des intoxications moyennes, à condition de corriger la déshydratation initiale et de surveiller la kaliémie.
En cas d'intoxication grave, la dialyse péritonéale ou l'hémodialyse permettent de corriger la part d'acidose métabolique et d'accroître l'élimination des salicylés. L'hémoperfusion est effectuée pour des concentrations sanguines en salicylés supérieures à 1 200 mg/L, 6 heures après l'ingestion.

H. Prévention

L'emploi de « blisters » a abaissé la sévérité des intoxications salicylées de l'enfant. Diverses mesures de sécurité (réduction des doses, bouchon de sécurité) se sont avérées très efficaces aux États-Unis.
Les erreurs thérapeutiques par confusion entre forme adulte et forme enfant de dérivés salicylés solubles devraient être évitées par des présentations bien distinctes des conditionnements.

I. Autres problèmes toxiques

1. Intoxication à long terme

La prise d'aspirine au long cours expose à des accidents :
- rénaux : on rapporte des néphrites interstitielles et nécroses papillaires pour des prises chroniques depuis au moins 3 ans. L'association de paracétamol favorise l'apparition de la toxicité rénale. On décrit également des syndromes de Fanconi ou de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique ;
- hépatiques, sous forme d'une hépatotoxicité potentielle : la biopsie hépatique montre une nécrose hépatocellulaire avec infiltration inflammatoire périportale et dégénérescence graisseuse de l'hépatocyte ;
- digestifs, sur la muqueuse gastrique ;
- l'intoxication chronique peut, chez l'enfant, conduire à une déshydratation, des convulsions ou une acidose.

2. Syndrome de Reye

Chez des personnes susceptibles, après atteinte virale traitée par l'aspirine, et particulièrement chez l'adulte, on constate une encéphalopathie en 48 heures avec vomissements, délire, coma, mydriase et une infiltration graisseuse du foie.

J. Toxicologie analytique

La caractérisation des salicylés peut se faire rapidement dans l'urine grâce à une bandelette réactive au perchlorure de fer (Phenistix), qui vire au violet lorsque la salicylémie est supérieure à 200 mg/L. Il existe de faux négatifs, si le pH urinaire est acide.
Les salicylés peuvent être dosés dans le sérum et l'urine par la réaction de Trinder. Les ions salicylates en présence de perchlorure de fer donnent une coloration mauve dont l'intensité est appréciée à 540 nm. La réalisation d'une gamme d'étalonnage permet une quantification des salicylés.
Les salicylés peuvent être également déterminés par une méthode immunologique en polarisation de fluorescence.
La chromatographie liquide de haute performance permet également le dosage de l'acide salicylique et de son métabolite, l'acide gentisique, à partir des liquides biologiques. La séparation se fait sur différentes colonnes. Les composés sont détectés à 270 nm et quantifiés par rapport à un étalon interne.

II. Paracétamol

A. Introduction

Le paracétamol (*acetaminophen* aux États-Unis), dérivé de la phénacétine, est utilisé pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques. Il possède un faible risque d'effets indésirables à dose thérapeutique (0,02 à 0,05 g/kg/jour chez l'enfant et 1 à 3 g chez l'adulte). Lors de surdosages, une nécrose hépatocytaire grave (parfois mortelle) peut survenir, et plus rarement une insuffisance rénale organique.
La Pharmacopée française comporte de nombreuses spécialités en gélules ou comprimés contenant du paracétamol seul ou en association avec d'autres principes actifs. Le paracétamol est également le constituant principal de sirops (*tab.* 2).

B. Toxicocinétique

- À dose thérapeutique, l'absorption du paracétamol est rapide et totale au niveau de l'intestin grêle ; elle est plus lente à dose massive.
- Sa concentration sanguine maximale est atteinte pour des taux thérapeutiques entre 30 et 90 minutes après ingestion. Au cours d'un surdosage, l'absorption gastrique peut se prolonger (jusqu'à 4 heures), en fonction de la réplétion gastrique.
- La liaison protéique du paracétamol est faible (15 à 20 %) et sa demi-vie est de deux heures ; elle est prolongée en cas de dose massive ou de cirrhose.
- Le paracétamol se distribue en grande quantité au niveau hépatique et rénal.
- Le paracétamol passe la barrière placentaire, mais aucun effet tératogène n'est rapporté.

Tableau 2. Spécialités pharmaceutiques contenant du paracétamol (Vidal® 2006)

Paracétamol seul	Associations de paracétamol avec un autre principe actif	
Claradol	Actifed jour et nuit	Fervex
Dafalgan	Actifed Rhume	Fervex sans sucre
Doliprane	Actron	Humex Rhume
Doliprane sans sucre	Algisedal	Ixprim
Dolitabs	Céfaline Hauth	Klipal Codéine
Dolko	Claradol Caféine	Lamaline
Dolotec	Claradol Codéine	Lindlane
Efferalgan	Codoliprane	Migralgine
Efferalgan pédiatrique	Coquelusédal Paracétamol	Novacétol
Efferalganodis	Dafalgan Codéine	Prontalgine
Expandox	Dextroref	Propofan
Geluprane	Di Dolko Gé	Rhinofébral
Panadol	Dialgirex Gé	Rhinofébral Verveine-Miel-Citron
Paracétamol SmithKline Beecham	Diantalvic	Salipran
Paralyoc	Dioaldgo Gé	Sédarène
Perfalgan	Doli Rhume	Suppomaline
	Doliactic	Théinol
	Efferalgan Codéine	Trophirès Composé
	Efferalgan Vitamine C	Zaldiar

- Le paracétamol est métabolisé par le foie. À doses thérapeutiques, les métabolites sont surtout des glucurono- et des sulfoconjugués. Une faible quantité de paracétamol se retrouvant sous forme inchangée dans l'urine ; toutefois, une faible fraction est transformée par les cytochromes P450 (1A2, 2E1, 3A4) en N-hydroxyparacétamol, lui-même transformé en N-acétyl-p-benzoquinonéimine, métabolite fortement réactif qui sera par la suite normalement inactivé par le glutathion réduit (*fig. 3*). Au niveau rénal, il a été démontré que la prostaglandine H synthétase, pouvait générer un radical libre, qui exercerait une action toxique directe sur le rein.
- Lors d'ingestions massives, le système protecteur du glutathion est dépassé et les métabolites électrophiles non détoxifiés se lient aux protéines hépatiques de façon covalente et peuvent provoquer une nécrose hépatique centrolobulaire.

La toxicité du paracétamol est augmentée par les inducteurs enzymatiques (barbituriques, alcool) et par la déplétion en glutathion. De plus, on peut constater une hépatotoxicité sévère à dose thérapeutique chez certains sujets éthyliques chroniques. Le mécanisme de cette toxicité correspond à l'activation du système du cytochrome P450, associé à une déplétion intracellulaire en glutathion. Elle est diminuée par les précurseurs du glutathion ou par des donneurs de groupements sulfhydryles (méthionine, cystéamine, N-acétylcystéine).

O-Glucuronide*
OH
O-Sulfate*
Cytochromes P_{450}
Glutathion (GSH)
Protéines cellulaires
—S—G
—macromolécules
Acide mercapturique*
Mort hépatocellulaire

Figure 3. Schéma métabolique du paracétamol

C. Intoxication aiguë

Le déroulement clinique de l'intoxication aiguë comprend trois phases *(tab. 3)* :

- *phase I* : l'intoxication peut être totalement asymptomatique mais, fréquemment, on observe des nausées et des vomissements. Seuls les tests hépatiques peuvent traduire une toxicité hépatique. L'activité des transaminases (TGO et TGP) s'élève 12 à 48 heures après l'ingestion de fortes doses. La conscience est normale et le risque est alors de sous-estimer la gravité réelle de l'ingestion du toxique ;

- *phase II* : à partir de la 24e heure, les signes digestifs s'accentuent et les signes biologiques de cytolyse hépatique et parfois d'atteinte tubulaire rénale apparaissent. Les transaminases augmentent, elles vont atteindre leur maximum au 3e jour ;
- *phase III* : à ce stade d'hépatite cytolytique, les douleurs abdominales, diffuses ou plus localisées dans l'aire hépatique, sont fréquentes. Un ictère, très inconstant, peut apparaître. L'atteinte rénale, rare, peut être asymptomatique, elle est diagnostiquée sur la créatininémie. Elle peut être évoquée devant une oligoanurie ou des lombalgies bilatérales. Elle réalise un tableau de néphropathie tubulaire aiguë ; l'absence d'anomalie de la créatininémie trois jours après l'intoxication rend peu probable cette tubulopathie. L'anurie n'existe que dans les formes graves. Toute la gravité de l'intoxication peut résulter de l'apparition d'une insuffisance cellulaire grave (encéphalopathie hépatique), apparaissant vers le 4e, 5e jour, caractérisée par astérixis et troubles de la conscience, et confirmée par les signes électroencéphalographiques, d'où l'intérêt d'une surveillance régulière du taux de prothrombine, de la glycémie et de l'état de conscience.

Tableau 3. Phases cliniques de l'intoxication par le paracétamol

Phase	Durée	Troubles caractéristiques
I	0,5 – 24 heures	Douleurs abdominales. Anorexie, nausées, vomissements. Malaise, somnolence.
II	24 – 48 heures	Période de récupération apparente. La nécrose hépatique se développe. Débit urinaire faiblement diminué.
III	3 – 5 jours	Hépatotoxicité, jaunisse. Troubles de la coagulation. Hypoglycémie, encéphalopathie. Troubles rénaux, myocardiopathie. Coma, mort.

Les lésions histologiques hépatiques consistent en une nécrose hépatocytaire qui prédomine dans les régions centrolobulaires, accompagnée ou non d'une réaction inflammatoire souvent modérée. Dans les cas les plus favorables, la régénération hépatique peut être totale en quelques semaines.
Des acidoses lactiques, un coma et une hyperamylasémie ont pu être observés dans quelques cas d'intoxication aiguë par le paracétamol.

D. Pronostic

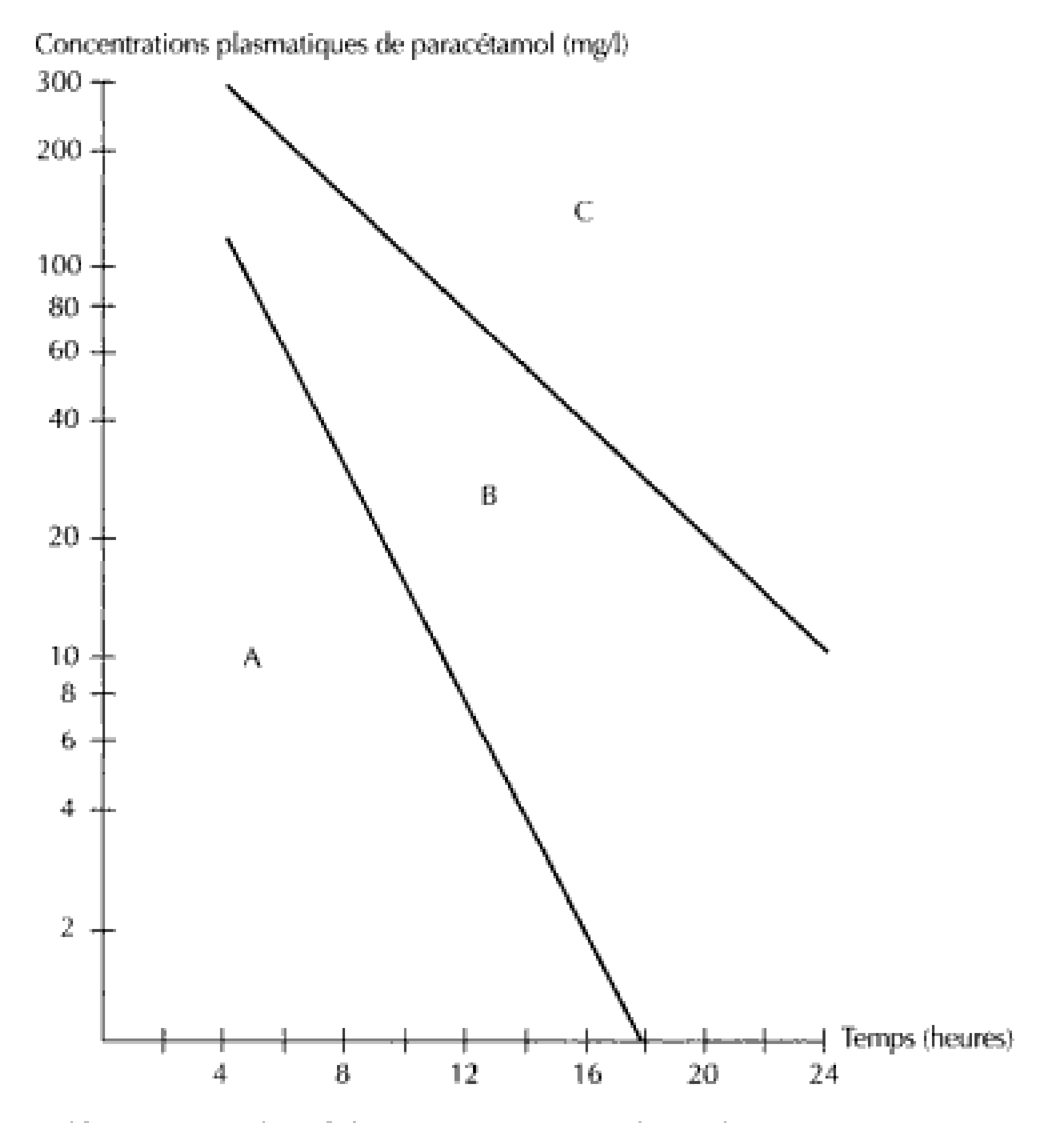
Le pronostic peut être formulé sur un certain nombre de critères :
- l'existence d'une atteinte organique rénale et la sévérité des troubles précoces de la coagulation sont deux éléments péjoratifs ;
- les meilleurs arguments sont d'ordre toxicologique : dose absorbée, taux sanguins et demi-vie plasmatique.

Pour un adulte ou un grand enfant, le risque d'hépatite cytolytique existe pour une dose ingérée supérieure à 6 g. Le risque létal n'apparaît que pour les doses supérieures à 10 g. Chez l'enfant de 10 à 20 kg, aucune intoxication grave n'est notée pour une dose ingérée inférieure ou égale à 300 mg/kg.

La concentration plasmatique sanguine du paracétamol permet de confirmer le pronostic du sujet, surtout si le délai qui sépare l'heure de l'ingestion du prélèvement sanguin est connu :

- il existe un risque très élevé d'hépatite grave lorsque la paracétamolémie se situe au-dessus de 200 mg/L à la 4e heure, 100 mg/L à la 8e heure et 50 mg/L à la 12e heure ;
- ce risque reste réel lorsque la paracétamolémie est comprise entre 120 et 200 mg/L à la 4e heure, entre 60 et 100 mg/L à la 8e heure et entre 30 et 50 mg/L à la 12e heure ;
- une concentration de paracétamol inférieure à 120 mg/L à la 4e heure, 60 mg/L à la 8e heure et 30 mg/L à la 12e heure, élimine le risque d'atteinte hépatique.

Des abaques permettent de déterminer la gravité de l'intoxication pour des concentrations et des heures de prélèvements différents (mais, pour que cette concentration soit interprétable, le délai entre l'ingestion et le prélèvement doit être au moins de 4 heures) (*fig.* 4). L'évaluation de la demi-vie du paracétamol confirme le pronostic : une demi-vie supérieure à 4 heures témoigne de l'apparition d'une hépatite cytolytique. L'allongement de la demi-vie au-delà de 12 heures rend très probable la survenue d'une insuffisance hépatocellulaire grave.



(A) absence d'hépatotoxicité, (B) hépatotoxicité potentielle, (C) hépatotoxicité.

Figure 4. Concentrations plasmatiques de paracétamol en fonction du temps

E. Traitement

Il repose sur trois principes :
- évacuation du toxique ;
- prévention de l'atteinte cytolytique hépatique et éventuellement rénale ;
- traitement symptomatique.

L'administration de charbon activé n'est effectuée que pour une intoxication vue dans l'heure suivant l'ingestion. Les techniques d'épuration extrarénale ne présentent pas d'intérêt.

Le charbon activé peut réduire de 50 % à 80 % la biodisponibilité du paracétamol (Carbomix®). Mais son utilisation ne permet plus l'administration orale de N-acétylcystéine, qui doit alors être administrée par voie veineuse.

La prévention des lésions de cytolyse fait appel à l'administration précoce (avant la 10e heure) de précurseurs du glutathion ou d'autres molécules riches en groupements SH (le glutathion ne peut être utilisé à cause de sa faible diffusion cellulaire). Le produit le plus efficace, pouvant être administré par voie intraveineuse, est la N-acétylcystéine. Elle peut être administrée selon le protocole suivant :
- dose initiale : 150 mg/kg dans 250 mL de sérum glucosé isotonique en 15 minutes ;
- perfusion de 50 mg/kg dans 500 mL de sérum glucosé isotonique, les quatre heures suivantes ;
- perfusion de 100 mg/kg dans 1 litre de sérum glucosé isotonique, les 16 heures suivantes.

Soit au total 300 mg/kg en environ 20 heures.

Le recours à la voie veineuse est nécessaire en cas de troubles de la conscience, de nausées, de vomissements, d'administration orale de charbon activé.

La N-acétylcystéine peut être administrée par voie orale, la dose de charge est de 140 mg/kg puis 70 mg/kg toutes les quatre heures, pendant 72 heures (17 doses).

En ce qui concerne les indications du traitement spécifique, il est conseillé de le débuter le plus tôt possible sans attendre le résultat du dosage de paracétamol. Mais, en fonction de l'interprétation pronostique, ce dosage dira si oui ou non l'administration de N-acétylcystéine doit se poursuivre. L'attitude actuelle consiste à poursuivre l'administration de N-acétylcystéine lors d'une intoxication potentiellement grave tant que la paracétamolémie est détectable au-delà des 24 premières heures. La N-acétylcystéine, contrairement à la méthionine, permettrait la synthèse *de novo* de glutathion détoxifiant le métabolite toxique, mais agirait aussi sur les protéines à thiol, parmi lesquelles les ATPases servent au transport de calcium ; ce rôle est important pour la survie de l'hépatocyte et permet de réparer, même tardivement, les membranes. De plus, la N-acétylcystéine (comme la méthionine, source de soufre), permettrait la formation plus importante du dérivé sulfoconjugué.

Le traitement symptomatique est le suivant :
- en cas d'insuffisance hépatocellulaire : apport de glucose ;
- en cas d'insuffisance rénale organique : le furosémide permet de relancer la diurèse, et une compensation des pertes urinaires par perfusion d'électrolytes permet d'éviter le recours à l'épuration extrarénale, qui n'a pas d'intérêt puisque le paracétamol à une clairance corporelle de 350 mL/min.

La transplantation hépatique doit être envisagée si les transaminases sont très élevées, si le temps de coagulation est supérieur à 180 secondes avec un taux de facteur VIII inférieur à 20 % et s'il existe une encéphalopathie grave.

F. Toxicologie analytique

Les méthodes de recherche et de dosage du paracétamol sont nombreuses. Nous citerons les techniques les plus usitées.

1. Technique immunologique par polarisation de fluorescence

La sensibilité de la méthode est de 0,7 mg/L.

2. Chromatographie en phase gazeuse

De nombreuses méthodes de chromatographie en phase gazeuse ont été décrites dans la littérature. Les différences portent sur les procédés d'extraction, les étalons internes utilisés et le choix des agents de dérivation (la formation de dérivés acétylés est le plus souvent décrite). Ces méthodes présentent une excellente spécificité et sensibilité.

3. Chromatographie liquide haute performance

De nombreuses techniques de dosage ont été décrites. Certains préconisent une extraction préalable du paracétamol par un solvant organique. D'autres consistent à injecter directement l'échantillon mélangé à l'étalon interne (qui peut être de nature variée). L'absorption du paracétamol est maximale à 250 nm. Cette technique est spécifique, sa sensibilité est de l'ordre de 0,1 mg/L.

4. Spectrophotométrie UV

La méthode est basée sur l'absorption différentielle, dans l'UV à 266 nm du paracétamol à deux valeurs de pH. Le paracétamol est extrait par un mélange alcool-éther. L'extrait est séché et le résidu sec est repris par une solution de bicarbonate de sodium, purifié par un lavage au chloroforme. Une partie de la solution aqueuse est alcalinisée en présence de soude N. On détermine la densité optique à 266 nm par rapport à la solution non alcalinisée. Une gamme de paracétamol permet la quantification. Cette méthode longue est assez sensible (5 mg/L).

5. Méthodes colorimétriques

Elles reposent sur l'un des trois principes suivants et se réfèrent à une gamme étalon. Après précipitation des protéines :

- le paracétamol est dosé à l'état de nitro-2 acétamino-4 phénol, après action de l'acide nitrique. Le composé obtenu donne, en milieu alcalin, une coloration jaune orangé dont l'intensité est lue à 430 nm (méthode appliquée dans le cas des surdosages) ;
- le paracétamol est hydrolysé par l'acide perchlorique par colorimétrie, l'amino-4-phénol formé est transformé en indophénol, par action de l'o-crésol en milieu ammoniacal. L'intensité de la coloration est lue à 615 nm La technique est rapide, applicable à des concentrations comprises entre 10 et 250 mg/L ;

- le paracétamol est hydrolysé en milieu chlorhydrique. On dose l'amino-4-phénol formé par diazocopulation avec l'acide nitreux et l'α-naphtol. La coloration formée est lue à 510 nm. La sensibilité de la méthode est de 1 mg/L dans le sang et de 2 mg/L dans les urines.

Conclusion

Le paracétamol a remplacé l'aspirine dans la plupart de ses emplois comme analgésique-antipyrétique. L'obligation, en France, de ne pas dépasser les 8 g de paracétamol par unité de conditionnement permet une large utilisation de cet antalgique et la réduction des complications toxiques rares et généralement réversibles qui résulteraient de surdosages.

L'essentiel de la question

Salicylés :
- doses toxiques : chez l'adulte, à partir de 10 g, et chez l'enfant, à partir de 150 mg/kg ;
- signes neurosensoriels importants à la phase centrale. Troubles du rythme respiratoire avec hyperpnée et alcalose respiratoire, puis acidose métabolique ;
- traitement évacuateur, alcalinisation des urines, ventilation mécanique, épuration extrarénale selon le tableau clinique et/ou salicylémie > 1,2 g/L.

Paracétamol :
- toxique lésionnel, dont les manifestations cliniques se manifestent avec un retard de 12 à 24 heures,
- risque de cytolyse hépatique avec maximum de signes biologiques au 3e jour ;
- traitement spécifique avec la N-acétylcystéine ;
- pronostic de l'intoxication basé sur différents critères : dose absorbée, paracétamolémie, demi-vie.

Pour en savoir plus

- Bismuth C., Baud F., Conso F., Fréjaville J.-P., Garnier R. *Toxicologie clinique*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1987.
- Parkinson A., « Biotransformation of xenobiotics » (p. 113-186) ; Snodgrass W.R., « Clinical Toxicology » (p. 969-986), in Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J. (eds). *Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons*, 3e éd. McGraw-Hill Companies, 1996.
- Ellenhorn M.J., Barceloux D.G. *Medical Toxicology, Diagnosis and treatment of Human Poisoning*. New York et Londres, Elsevier Publishing Company, 1988.
- Gossel T.A., Bricker J.D. *Principles and methods of Toxicology*. Student Edition. New York, Raven Press, 1989.
- Passeron D. « Intoxications par les antalgiques », in Danel V., Barriot P. (eds), *Intoxications aiguës*. Arnette, coll. Anesthésie et réanimation d'aujourd'hui, 1993.
- Megabarre B., Braud F. Intoxications aiguës médicamenteuses. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie – Pathologie professionnelle, 16-001-G-10, 2002.

Toxicologie des morphinomimétiques et antagonistes

R. CHAMBON-MOUGENOT, Laboratoire de Toxicologie,
Faculté de Pharmacie, Lyon.
B. FOUILLET, Laboratoire de Toxicologie, Faculté de pharmacie ISPB,
Université de Lyon (révision 2007)

À l'instar de leur chef de file, la morphine, isolée de l'opium par Sertürner au siècle dernier (1806), les morphinomimétiques et analogues sont pour la plupart des analgésiques.
Ces produits sont destinés à soulager les douleurs aiguës (postopératoires) ou chroniques (cancéreuses) résistant au paracétamol et à l'aspirine.
L'attitude vis-à-vis de la douleur a fortement évolué au cours des quinze dernières années. Elle s'est traduite par une prescription accrue de morphinomimétiques qui s'intègre dans une stratégie de prise en charge de la douleur proposée par l'OMS :
- *niveau 1 : analgésiques non morphiniques (paracétamol, aspirine, AINS) pour les douleurs modérées ;*
- *niveau 2 : agonistes morphiniques faibles (codéine, dextropropoxyphène) en cas de douleur résistant à 2-3 g d'aspirine/paracétamol par jour ;*
- *niveau 3 : (3a : oral ; 3b : parentéral) : en cas de douleurs sévères pour lesquelles on dispose :*
  - *d'agonistes purs : morphine, péthidine, fentanyl, dextromoramide,*
  - *d'agonistes partiels : buprénorphine,*
  - *d'agonistes-antagonistes mixtes : pentazocine, nalbuphine.*

Les morphinomimétiques sont des substances de synthèse, ressemblant à la morphine, se liant aux mêmes récepteurs, douées d'effets analgésiques centraux puissants mais dépourvues, au moins partiellement, de ses effets secondaires.
Les antagonistes morphiniques présentent suffisamment d'analogies avec les morphinomimétiques pour se fixer sur les mêmes récepteurs. Ils en diffèrent toutefois par la rigidité de la molécule due à la chaîne fixée sur l'azote et par leur affinité supérieure à celle des morphinomimétiques qu'ils vont antagoniser.

I. Physicochimie

La structure de base de tous ces composés est celle de la morphine (*fig. 1*). Les morphinomimétiques sont des dérivés de la morphine (phényl-4-pipéridines) et des analogues de synthèse (anilino-4-pipéridines et diphénylpropylamines). Les antagonistes morphiniques sont des dérivés N-substitués des précédents comme la Naloxone (*fig. 1*).

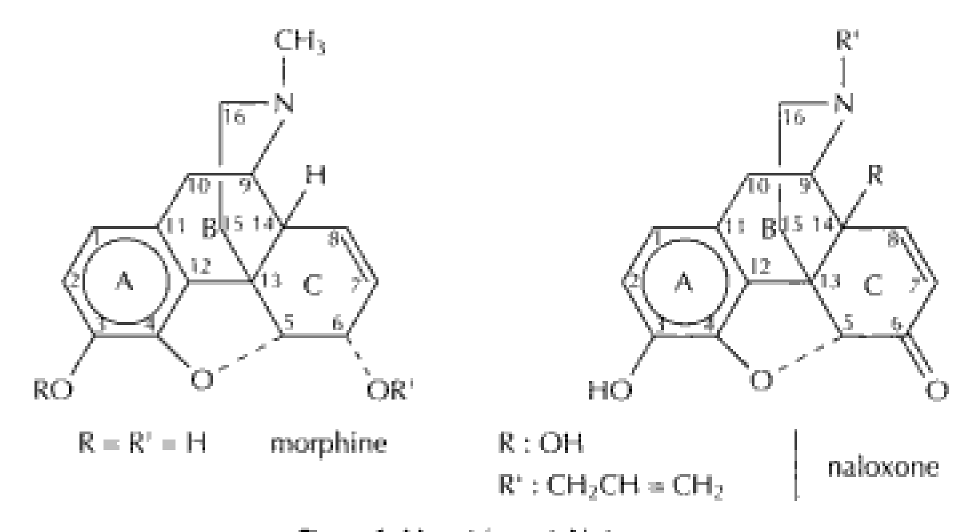


Figure 1. Morphine et Naloxone

Il faut souligner, de façon générale, l'importance de la fonction amine tertiaire, responsable de l'effet dépresseur respiratoire (qui disparaît chez les antagonistes), liée par un chaînon de trois atomes de carbone à un cycle aromatique porteur d'une fonction OH phénolique libre (responsable de l'effet analgésique et toxicomanogène). Les principaux dérivés morphinomimétiques et leurs antagonistes, classés en fonction de leur structure chimique, sont regroupés dans le *tableau 1*.
Nous nous bornerons, dans l'exposé qui va suivre, à l'étude des morphinomimétiques analgésiques et de leurs antagonistes, laissant volontairement de côté l'héroïne qui n'a pas d'usage thérapeutique ainsi que la codéine et les antitussifs. Il faut cependant signaler que la codéine fait un retour actuellement dans l'arsenal antalgique. Elle est moins puissante et moins toxique que la morphine, sans doute en raison de sa faible affinité pour les récepteurs opioïdes. Elle est souvent utilisée en synergie avec l'aspirine et le paracétamol.

Tableau 1. Morphinomimétiques et antagonistes

Morphinomimétiques	**Antagonistes**
Phényl-4-Pipéridines	*Phényl-4-Pipéridines substituées sur l'N*
Hexacycliques Buprénorphine (Temgésic®, Subutex®)	
Pentacycliques Morphine sulfate (Moscontin®, Skenan®, Actiskénan®) Morphine chorhydrate Codéine (OCH3 en 3) Codoliprane®, Dafalgan codéiné® Héroïne (OCOCH3 en 3 et 6)	Pentacycliques Nalorphine (Nalorphine®) (N-allyl) Naloxone (Narcan®, Nalone®) (id. + Cétone en 6) Naltrexone (Nalorex®, Revia®) (N-cyclopropylméthyl) Nalbuphine Gé® (N-cyclobutylméthyl)
Tricycliques Pentazocine (Fortal®)	
Bicycliques Péthidine Mépéridine (Dolosal®)	Tricycliques (Antagonistes mixtes) Pentazocine (Fortal®)
Anilino-4-Pipéridines Fentanyl (Fentanyl®, Durogésic®) Alfentanil (Rapifen®) Rémifentanyl (Ultiva®) Sufentanil (Sufenta®)	
Diphényl-Propylamines Méthadone (Méthadone®) Dextromoramide (Palfium®) Dextropropoxyphène (Diantalvic®, Propofan®)	

II. Recherche et dosage

L'analyse de ces substances dans les milieux biologiques peut se faire dans le sang ou dans les urines. En pratique, elle est surtout réalisée sur les urines car les morphiniques disparaissent rapidement de la circulation sanguine.
En raison de son caractère amphotère (basique par l'atome d'azote tertiaire, et acide par la fonction phénol libre) la morphine base est soluble dans l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le propanol et le chloroforme, mais insoluble dans l'éther.
On peut distinguer schématiquement les techniques de recherche rapides, semi-quantitatives (sans extraction) et les techniques fines de séparation et dosage (après extraction).

A. Techniques rapides sans extraction

- EMIT-DAU (*Drug Abuse in Urine*) : technique immunoenzymologique rapide (1 minute), sensible (0,5 ppm), applicable à la morphine, mais donnant des faux positifs (cas des antitussifs métabolisés en morphine) et des faux négatifs (en présence d'eau de Javel ou d'acide acétique ajoutés frauduleusement à l'urine et qui modifient le pH, ou de savon liquide qui amène une turbidité) ;
- TDX-Abbott : technique par polarisation de fluorescence, plus sensible (0,1 ppm) mais plus coûteuse ;
- RIA : radio-immuno-analyse, très sensible (0,05 ppm) semi-automatisée, mais nécessitant l'agrément du laboratoire pour manipuler les radioéléments.

En cas de positivité dans cette première étape, il est indispensable de confirmer le résultat par une technique plus fine, avec extraction, telle que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

B. Techniques fines avec extraction

- extraction par le chloroforme alcalin (pu 9-11) après hydrolyse acide ou enzymatique des conjugués ;
- réactions d'orientation : sur l'extrait évaporé à sec dans une capsule :
  - précipitation en milieu acide chlorhydrique par les réactifs généraux des alcaloïdes : iodobismuthique (Dragendorff), iodomercurique (Mayer),
  - coloration par réduction de réactifs sulfuriques : formolé (R. Marquis), sélénique (R. Lafon), molybdique (R. Froehde) ;
- séparation de l'extrait par chromatographie en couche mince (CCM) sur Silicagel GF 254, avec un solvant alcalin et révélation à l'iodoplatinate de potassium, par comparaison avec des substances témoins. C'est une méthode d'analyse assez grossière, qui a l'avantage d'être simple et peu coûteuse, mais qui nécessite une confirmation par chromatographie en phase liquide (HPLC) ou gazeuse (CPG) ;
- dosage de l'extrait par chromatographie en phase liquide (HPLC) avec détecteur spectrofluorimétrique. La limite de détection est de 0,1-10 µg de morphine par mL d'urine (0,1-10 ppm) ;
- dosage de l'extrait par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM). La limite de détection est de 1-250 ng de morphine par mL d'échantillon (1-250 ppb). C'est la méthode la plus fiable actuellement.

III. Pharmacocinétique

L'absorption par voie orale est faible en raison d'un effet de premier passage hépatique. La biodisponibilité varie de 20 % (buprénorphine) à 30 % (morphine, nalbuphine) ; plus rarement elle atteint 70 % (dextropropoxyphène et méthadone). Il existe sur le marché, depuis quelques années, une forme de morphine à action prolongée (Moscontin®) qui assure des taux sanguins (Cmax) moins élevés qu'une dose équivalente de solution buvable de morphine, avec un temps d'apparition du pic retardé (tmax = 2 à 3 heures au lieu de 30 minutes) mais avec une décroissance des taux plus progressive qui permet des administrations plus espacées (2 fois par jour). Par voie sous-cutanée ou intramusculaire, en revanche, les morphiniques sont rapidement absorbés (30 minutes). Si l'on adopte la voie médullaire, la pénétration est meilleure par voie péridurale, qu'intrathécale ou intraventriculaire. La fixation protéique varie de 35 % pour la morphine à 85 % pour le fentanyl, voire même 95 % pour la buprénorphine.
La distribution systémique est rapide dans le foie, les reins, les poumons et la rate. Au niveau du système nerveux, elle est variable en fonction du caractère lipophile des molécules qui conditionne le passage au travers de la barrière hémato encéphalique ; ainsi, le Fentanyl® passe beaucoup mieux que la morphine.
Le métabolisme des morphiniques est rapide : au niveau du foie, ils sont inactivés par glycuro et sulfoconjugaison, principalement, et accessoirement par oxydation ou N-déméthylation. À noter toutefois que dans le cas de la Péthidine on aboutit à la Nor-Péthidine qui est convulsivante.
L'excrétion est essentiellement urinaire, sous forme conjuguée surtout et accessoirement sous forme libre. En 24 heures on retrouve 80-90 % de la dose administrée dans l'urine. Une faible partie est normalement éliminée dans la bile (sauf pour la Péthidine = 70 %) et passe dans les fèces (7-20 %). La demi-vie d'élimination, après administration aiguë, oscille entre 3 heures et 4 heures (sauf pour le Dextropropoxyphène où elle atteint 14 heures).

IV. Pharmacotoxicologie

Les morphinomimétiques et analogues exercent leur action par l'intermédiaire de *récepteurs* opioïdes, capables de fixer outre les opiacés exogènes, des *ligands* peptidiques endogènes.
Parmi les cinq types de *récepteurs* initialement décrits chez le rat, on a pu en individualiser trois principaux : delta, kappa, et mu, qui ont été récemment rebaptisés OP1, OP2, OP3, suite à leur clonage par la technique de l'ADN recombinant.
On distingue en outre parmi les *ligands* endogènes ou endomorphines, trois grandes familles :
- les endorphines alpha, gamma, bêta, qui sont des neuropeptides à chaîne longue (16, 17, 31 aminoacides respectivement) qui sont doués d'une activité similaire à celle de la morphine ;

- les enképhalines (leu et met-enképhalines) qui sont des pentapeptides, trouvés dans le cerveau de porc et de bœuf tout d'abord, puis dans une hormone hypophysaire la β-lipotropine. La met-enképhaline renferme 91 acides aminés ;
- les dynorphines enfin.

A. Morphinomimétiques

Les morphinomimétiques sont des médicaments du système nerveux *(tab. 1)*. Ils agissent à trois niveaux :
- médullaire : au niveau de la corne postérieure de la moelle, inhibition présynaptique de la libération de substance P (= « *Pain* » = neuromédiateur de la douleur et de Nor-Adrénaline) avec stimulation des récepteurs opioïdes et libération d'enképhalines ;
- bulbaire : excitation sérotoninergique et inhibition des neurones nociceptifs ;
- suprabulbaire : action sur la composante psychomotrice de la douleur.

Les effets pharmacologiques qui en résultent sont à la fois centraux et périphériques :
- effets centraux :
  - analgésique : élévation du seuil de perception de la douleur et diminution de la réaction psychoaffective liée à l'intégration de la douleur en souffrance, d'où un état d'indifférence,
  - psychodysleptique : effet euphorisant qui explique le phénomène de dépendance (tendance à reprendre le médicament) et de tolérance (nécessité d'accroître les doses jusqu'à 10 fois et plus pour obtenir l'effet recherché). Cette euphorie fait place ensuite à un état dysphorique qualifié de « descente » par les toxicomanes, et qui correspond au syndrome de sevrage déclenché par une libération anormale de noradrénaline,
  - dépresseur du centre respiratoire : provoque un ralentissement de la fréquence respiratoire, pouvant aboutir à une apnée,
  - dépresseur hypophysaire : réduit la sécrétion de FSH et LH (entraînant une aménorrhée) ainsi que celle de l'ACTH (provoquant l'abaissement du taux plasmatique de cortisol) ;
- effets périphériques :
  - cardiovasculaire : vasodilatation périphérique, hypotension artérielle et bradycardie sinusale,
  - bronchique : effet bronchostricteur par suite d'une histaminolibération,
  - digestif : nausées, vomissements, constipation,
  - utérus : diminution des contractions, ralentissement du travail de l'accouchement,
  - reins : rétention d'urine et insuffisance rénale,
  - pupille : myosis.

Les effets toxicologiques des morphinomimétiques relèvent soit de l'intoxication chronique (faibles doses, répétées, lors d'un usage thérapeutique ou d'une toxicomanie), soit de l'intoxication aiguë (forte dose, isolée, correspondant à ce que l'on nomme « *overdose* » chez les toxicomanes).
- Toxicité chronique :
  - troubles psychiques : caractère replié, asocial, apathie et syndrome déficitaire avec diminution de l'attention et de la mémoire,

- dépendance : psychique (envie de reprendre le médicament pour jouir de ses effets) et physique (besoin de renouveler la prise afin d'éviter les troubles de sevrage qui apparaissent dans les 8 à 12 heures). Ces troubles correspondent à l'état de manque et se traduisent par une anxiété avec agitation et insomnie, des douleurs articulaires et musculaires, une tachycardie et une polypnée avec hypertension et mydriase, des nausées et vomissements avec sueurs. Ils sont parfois accompagnés d'hallucinations et de délire. À l'exception de la buprénorphine et du dextropropoxyphène, tous les dérivés morphinomimétiques sont capables d'induire ces phénomènes ce qui leur vaut d'être classés comme stupéfiants,
- amaigrissement : conduisant à la cachexie et pouvant entraîner la mort,
- complications : constipation iléus, aménorrhée ;

• toxicité aiguë :
- dépression respiratoire : élément fondamental de l'intoxication (entraînant anoxie et cyanose) pouvant se compliquer d'un œdème aigu du poumon accompagné de fièvre, qui met en jeu le pronostic vital,
- état de stupeur ou coma,
- myosis serré bilatéral en tête d'épingle (sauf Péthidine),
- bradycardie sinusale et bloc auriculoventriculaire avec hypotension (sauf Péthidine et Pentazocine).

Il convient d'ajouter à cela les effets indésirables fréquents (troubles gastro-intestinaux) qui correspondent à l'exacerbation des effets pharmacologiques de ces molécules. Nous les reverrons ultérieurement afin de sérier leurs contre-indications.

B. Antagonistes morphiniques

Ils peuvent se répartir en trois catégories selon que leur activité est purement antagoniste ou seulement partiellement antagoniste et partiellement agoniste morphinique. On distingue ainsi :

• antagonistes purs : antidotes habituels des morphiniques, représentés classiquement par la Naloxone (Narcan®) et plus récemment par la Naltrexone (Nalorex®) ;
• antagonistes partiellement agonistes : doués d'effets analgésiques comme la buprénorphine (Temgesic®) et la nalbuphine (Nubain®) ;
• antagonistes-agonistes mixtes : possédant un effet morphinique d'emblée, mais manifestant des effets antagonistes et antidotes si leur administration a lieu après un morphinomimétique. C'est le cas de la nalorphine (Nalorphine®) qui est le composé le plus ancien parmi les antagonistes et auquel on préfère actuellement la naloxone et de la pentazocine (Fortal®). Le butorphanol (Stadol®) qui n'existe pas en France entre aussi dans cette catégorie.

Les antagonistes morphiniques se lient aux mêmes récepteurs que les morphinomimétiques dont ils vont les déplacer en raison de leur affinité supérieure.

Leurs effets indésirables correspondent soit à une réaction de type morphinomimétique pour les antagonistes partiels ou mixtes (somnolence, vomissements, hypotension pour la nalorphine et la nalbuphine, et risque de tolérance-dépendance), soit à un syndrome de sevrage pour les antagonistes purs (anxiété, frissons, hyperpnée et vomissements à forte dose pour la naloxone et la naltrexone).

V. Traitement des intoxications

Dans l'intoxication chronique ou toxicomanie, on pratiquait classiquement la réduction progressive des doses de morphinique, compensée par l'administration d'un antalgique (Diantalvic®) ou d'un spasmolytique (Visceralgine®), d'un sédatif anxiolytique (Valium®) et d'un neuroleptique (Dogmatil®) afin de pallier les effets du syndrome d'abstinence.
Le traitement substitutif à la méthadone, longtemps réservé à l'hôpital Sainte-Anne et à l'hôpital Fernand-Widal à Paris, a vu depuis 1995 son champ d'application s'élargir grâce à l'AMM accordée au laboratoire Mayoli Spindler pour le sirop de Méthadone. Cependant, du fait de son pouvoir toxicomanogène reconnu, la méthadone relève du régime des stupéfiants et reste un médicament à PIH (Prescription initiale hospitalière) avec une dose moyenne de 60 mg/jour. Il faut noter qu'à la même époque l'arsenal thérapeutique s'est enrichi avec la mise sur le marché de comprimés de buprénorphine (Subutex®) à visée substitutive, plus fortement dosés (6-8 mg/jour) dont le maniement est plus simple puisqu'ils relèvent de la liste I. Toutefois, le succès de ces thérapeutiques substitutives reste étroitement lié à la qualité du suivi médico-socio-psychologique des toxicomanes qui repose sur un réseau de CSST (Centres de soins spécialisés aux toxicomanes) assistés de médecins généralistes et de pharmaciens volontaires.
Actuellement, on utilise aussi le traitement par la Clonidine (α2-stimulant) qui inhibe les effets du syndrome de sevrage, à raison de 17 µg/kg/jour en doses fractionnées, par voie orale, pendant 10 jours. Le risque d'hypotension nécessite l'hospitalisation du patient.
Le traitement de soutien de la toxicomanie aux opiacés fait aussi appel à la naltrexone (Nalorex®) qui est un antagoniste pur des morphiniques. Il présente l'avantage d'être peu toxique et de ne nécessiter qu'une prise quotidienne de 50 mg par voie orale. La durée du traitement est au minimum de 3 mois.
Dans l'intoxication aiguë, avec dépression respiratoire, on administre de la naloxone (Narcan®) à raison de 0,01 mg/kg par voie intraveineuse. Son action est rapide et survient en moins d'une minute mais sa durée d'action est courte (60 minutes). L'injection pourra être renouvelée prudemment jusqu'à correction des troubles respiratoires et de conscience.
La naloxone peut être utilisée sans risque comme test diagnostic en cas de coma d'étiologie inconnue pour lequel on suspecte un analgésique morphinique. Elle déclenche très rapidement un syndrome de sevrage, qui disparaît en quelques minutes.

VI. Usages thérapeutiques

Les morphinomimétiques et antagonistes ont longtemps été administrés principalement par voie parentérale (IM, IV, médullaire) et accessoirement par voie orale ou rectale. Les médicaments de cette catégorie, figurant au dictionnaire Vidal, sont regroupés dans le *tableau 2*.

Tableau 2. Médicaments morphiniques et antagonistes figurant au Vidal 2007

	Spécialités		DCI du principe actif	AMM	Formes		Laboratoires
	Liste I (ou hors liste)	Stupéfiants			Orales	Injectables (et divers)	
Antagonistes	Nalorex®, Revia®		Naltrexone	1985	×		Du Pont Pharma
				1996	×		Du Pont Pharma
	Nalorphine®		Nalorphine	1958		×	L'Arguenon SERB
	Narcan®		Naloxone	1977		×	Du Pont Pharma
				1981		×	SERB
	Nalbuphine®		Nalbuphine	1987		×	Du Pont Pharma
Morphiniques	Diantalvic®		Dextropropoxyphène	1962	×	(suppo)	Hoechst Houdé
	Dexir®		Dextrométhorphane	1987	×		Oberlin
	Dicodin®		Dihydrocodone	1989	×		Asta Medica
		Péthidine®	Péthidine	1942		×	Spécia
		Oxycontin®	Oxycodone				
		Durogésic®	Fentanyl	1997		(transderm)	Janssen Cilag
		Méthadone®	Méthadone	1995	×		Mayoli Spindler
		Morphine®	Morphine chorhydrate	1962	×		Chaix, Cooper
		Moscontin®	Morphine sulfate	1986	×	(suppo)	Asta Medica
	Néo codion®		Codéine camsilate	1950	×	×	Bouchara
		Rapifen®	Alfentanil	1984			Janssen Cilag
	Subutex®		Buprénorphine	1995	×	×	Schering Plough
		Sufenta®	Sufentanil	1991		×	Janssen Cilag
	Temgésic®		Buprénorphine	1984	×	×	Schering Plough
	Topalgic®		Tramadol	1995	×		Hoechst Houdé
		Ultiva®	Remifentanil				

On note, depuis peu, une recrudescence d'usage de la voie orale qui s'est traduite par la mise sur le marché de comprimés de sulfate de morphine retard ou Moscontin® puis de buprénorphine ou Subutex®. À côté de cela, il faut également mentionner l'existence de préparations magistrales buvables à base de chlorhydrate de morphine connues sous le nom d'élixir de Brompton ou de *Saint Christopher's hospital* (qui renferment en outre de la cocaïne, de l'alcool, de l'eau chloroformée et du sirop simple) qui sont prescrites dans les états hyperalgiques chroniques. Il est admis à l'heure actuelle que l'administration doit être régulière, dictée par la pharmacocinétique (habituellement 6 fois par jour avec l'élixir de Brompton et 2 fois par jour seulement avec le Moscontin®) ou le Skenan®, voire une seule fois avec le Kapanol® (sulfate de morphine à libération prolongée) sans attendre une recrudescence de la douleur. C'est pourquoi la *Pharmacopée* (1988, 10e édition) a relevé les doses maximales de morphine à 30 mg par dose et 180 mg par jour pour la voie orale.

Le *JO* du 24 septembre 1997 suivant les avis de la *Pharmacopée* française a supprimé la dose maximale de 180 mg/jour laissant place à la possibilité d'augmenter les doses de morphine jusqu'à l'obtention d'une antalgie satisfaisante, sous réserve du contrôle des effets secondaires. On associe souvent cas le patient à cette adaptation posologique grâce au système dit PCA (« *Patient controlled analgesia* »).

Il faut noter que l'élixir de Brompton tend à être remplacé par une solution de chlorhydrate de morphine dans l'eau chloroformée, plus concentrée, et permettant donc de réduire les volumes à ingérer par les patients.

Schématiquement, on peut dire que la voie orale est plus adaptée à l'usage à domicile, et la voie parentérale à l'usage en milieu hospitalier où l'on dispose à l'heure actuelle d'un arsenal sophistiqué de pompes implantables.

En ce qui concerne les *morphinomimétiques*, comme indiqué précédemment, nous n'avons retenu que l'étude des composés antalgiques qui peuvent être prescrits soit comme analgésiques, soit comme anesthésiques.

Dans leur première indication, les morphinomimétiques ne seront prescrits que dans le cas de douleurs de forte intensité (stade II ou III) :

- douleurs chroniques d'origine néoplasique ;
- douleurs aiguës postopératoires ou polytraumatiques (à l'exclusion des traumatismes crâniens où l'action centrale des morphiniques gêne la surveillance neurologique), infarctus du myocarde, coliques néphrétiques et hépatiques (en association avec un antispasmodique), chez les grands brûlés.

Les molécules utilisables sont choisies en fonction de deux critères qui sont leur durée d'action (par voie parentérale le plus souvent) et leur intensité d'action (estimée par la mesure des doses équianalgésiques en référence à la morphine), (*tab.* 3).

L'adaptation posologique doit se faire en tenant compte des particularités physiologiques liées à l'âge. On note une sensibilité accrue à la dépression cardiorespiratoire chez le vieillard et chez l'enfant. Les états pathologiques et en particulier l'insuffisance hépatique ou rénale nécessitent également des posologies réduites.

Pour l'usage anesthésique, on dispose de trois substances qui sont le sufentanil (Sufenta®), le fentanyl (Fentanyl®) et l'alfentanil (Rapifen®) dans l'ordre d'activité décroissante. Ces molécules sont actives à très faible dose (de l'ordre de 0,10 mg) et sur un laps de temps assez court (1 à 2 heures).

Tableau 3. Classification des effets analgésiques des morphinomimétiques

	Durée d'action	Ordre croissant des doses Équianalgésiques
Fentanyl (Fentanyl®)	1 à 2 heures	0,1 mg
Buprénorphine (Subutex®)	6 à 8 heures	0,3 mg
Méthadone (Méthadone®)	8 à 12 heures	8 mg
Morphine	4 à 7 heures	10 mg
Péthidine	2 à 4 heures	100 mg
Codéine	4 à 6 heures	120 mg
Dextropropoxyphène (Diantalvic®)	4 à 6 heures	240 mg

En ce qui concerne les *antagonistes morphiniques*, on retiendra leur indication majeure comme antidote de la dépression respiratoire provoquée par les morphinomimétiques et accessoirement dans le traitement de la toxicomanie aux opiacés ou dans le traitement des douleurs intenses.
Les substances utilisables pour combattre la dépression respiratoire sont essentiellement la naloxone (Narcan®) et la nalorphine. La naloxone présente l'avantage d'être un antagoniste pratiquement pur, d'action rapide (1 minute) mais qui ne peut pas être utilisée chez l'enfant avant 3 ans. En revanche, la nalorphine peut être employée chez le nouveau-né mais elle présente un certain nombre d'inconvénients (réactions neurovégétatives dues à ses effets agonistes partiels).
Le traitement de la toxicomanie aux opiacés fait appel à la naltrexone (Nalorex®) en postcure et dans la prévention des rechutes. Ce médicament présente l'avantage d'être administrable par voie orale à raison d'une seule prise quotidienne (50 mg) ce qui facilite l'observance du traitement.
Enfin, en raison de ses propriétés partiellement agonistes, la nalbuphine (Nubain®) est utilisée comme antalgique dans les douleurs sévères. Son activité est égale à celle de la morphine mais elle présente par rapport à la majorité des morphinomimétiques analgésiques l'avantage de pouvoir être prescrite dès l'âge de 18 mois. Les modalités d'action de ces antagonistes sont résumées dans le *tableau 4*.

Tableau 4. Posologie et activité des antagonistes morphiniques

Naloxone (Narcan®)	Ampoules 0,4 mg/1 mL	IV actif en 1 min, durée 30 min	(maxi 4 mg)
Nalorphine (Nalorphine®)	Ampoules 10 mg/2 mL	IV actif en 20 sec, durée 1-4 heures	(maxi 40 mg)
Nalbuphine (Nalbuphine®)	Ampoules 20 mg/2 mL	IV actif en 3-15 min, durée 3-6 heures	(maxi 160 mg)
Naltrexone (Nalorex®)	Comprimés 50 mg	orale, durée 24 heures	1 par jour

VII. Effets indésirables et contre-indications

Les effets indésirables des morphinomimétiques et antagonistes sont souvent d'ordre neurovégétatifs (nausées, vomissements, hypotension). La constipation est constante. Ils correspondent dans l'ensemble à une exacerbation des effets pharmacologiques de ces substances. C'est le cas aussi de la dépression cardiorespiratoire et de la dépression du système nerveux central qui contre-indiquent ces médicaments chez les insuffisants respiratoires d'une part, et chez les conducteurs de véhicules d'autre part. Ils contre-indiquent également l'association avec un certain nombre de médicaments psychotropes (neuroleptiques, anticonvulsivants, antihistaminiques) avec l'alcool (qui accroît le risque de somnolence), avec les bêtabloquants (qui ont un effet bradycardisant) ainsi qu'avec d'autres morphinomimétiques.
Parmi les effets indésirables plus rares, il faut noter l'excitation du système nerveux central (délire, hallucination) qui peut se manifester avec la péthidine et la buprénorphine (Temgésic®) et qui contre-indiquent leur emploi chez les personnes âgées. L'association aux IMAO et aux analeptiques respiratoires est également fortement contre-indiquée en raison du risque d'hypertension et de convulsions qu'ils présentent.
Certains morphinomimétiques favorisent une histamino-libération comme le dextropropoxyphène (Diantalvic®), la péthidine et risquent donc de provoquer un rash cutané.
Les morphinomimétiques anesthésiques (fentanyl, alfentanil et sufentanil) présentent un risque de rigidité musculaire qui implique leur usage en association avec des curares et des anticholinergiques comme l'atropine, lors des anesthésies générales.
Les morphinomimétiques sont contre-indiqués chez la femme enceinte car ils traversent le placenta et risquent de provoquer des phénomènes de sevrage chez le nouveau-né avec dépression respiratoire à la naissance.
Ils sont également contre-indiqués chez l'enfant de moins de 15 ans, en général. La morphine et la péthidine sont toutefois autorisées avec précaution, au-delà de 30 mois. Les antagonistes morphiniques doivent également être utilisés avec précautions chez l'enfant : dès la naissance pour la nalorphine, à partir de 18 mois pour la nalbuphine et à partir de 3 ans pour la naloxone (Narcan®).
En raison des effets indésirables mentionnés précédemment, la thérapeutique par les morphinomimétiques devra s'accompagner de l'administration d'antinauséeux (métoclopramide = Primpéran® ; phénothiazines comme la prochlorpérazine = Tementil® ou la chlorpromazine = Largactil® ; halopéridol = Haldol®), de laxatifs (lactulose = Duphalac® ; extrait de cascara = Péristaltine®) voire même d'antimorphinique (naloxone = Narcan®) en cas de dépression respiratoire.

VIII. Législation

On remarque à la lecture du *tableau 2* que dans l'ensemble les morphinomimétiques appartiennent au cadre des *Stupéfiants* en raison de leur pouvoir toxicomanogène, tandis que les antagonistes morphiniques appartiennent plutôt à la *Liste I* des substances vénéneuses.

Cette classification est établie en conformité avec la nouvelle législation sur les substances vénéneuses (décret du 28 décembre 1988) en application depuis le 7 décembre 1990.
Elle vise à prévenir l'usage abusif de ces substances.

Pour en savoir plus

- Bannwarth B. *Analgésiques morphiniques : principes et règles d'utilisation.* Rev Prat, 1996 ; 46,1393-1398.
- Barthélémy J. *Toxicologie des morphiniques et des morphinomémétiques*, Lyon Pharm, 1988 ; 39 : 83-104.
- Benoist J.-M. *Le point sur les analgésiques morphiniques.* Med et Hyg 1994 ; 52 : 826-835.
- Schorderet M. *Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, Éditions Slatkine, Genève, 2e ed. 1992.
- Hachelat S., Cappellier G. and Danel V. *Les toxidromes.* Réanimation 2006 ; 15 : 364-369
- Schück S, Allain H. *La douleur : moyens et stratégies thérapeutiques.* Rev Prat 1997 ; 47 : 555-569.

Toxicomanies : cannabis, opiacés, cocaïne, amphétamines, ecstasy, LSD

D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit
et Faculté de Pharmacie, Poitiers.
S. PIROT, Association pour la Neuro-Psycho-Pharmacologie, Paris.
J.-L. SENON, Service de psychiatrie et de psychologie médicale,
centre hospitalier Henri Laborit et CHU, Poitiers.

VI. Amphétamines

A. Pharmacologie cellulaire
B. Clinique
C. Intoxication aiguë

VII. Ecstasy (MDMA)

A. Pharmacologie
B. Clinique
C. Intoxication aiguë

VIII. LSD

A. Classification
B. Pharmacologie
C. Manifestations psychiques
D. Manifestations neurovégétatives
E. Dépendance et tolérance

I. Des drogues à la drogue

A. Définition

L'origine même du terme de « drogue » fait l'objet de controverses. Selon certains auteurs, ce vocable dérive du persan *droa*, « odeur aromatique » ; pour d'autres, il proviendrait de l'hébreu *rakab*, « parfum » ; pour d'autres enfin, les plus nombreux, il aurait pour origine un mot néerlandais, *droog*, désignant les substances végétales séchées, et, particulièrement, les substances vendues par les apothicaires. Cela explique que pour le pharmacien, aujourd'hui, soit au sens large considérée comme une drogue toute substance pharmacologiquement active sur l'organisme. Les Anglo-Saxons, on le sait, n'établissent d'ailleurs pas de distinction entre les deux notions et peuvent désigner par le terme de *drug* un médicament comme ils désignent ainsi une « drogue », entendue au sens de stupéfiant.
Cette approche du terme est donc sensiblement différente de celle réalisée par les médias, qui font des drogues des substances actives sur le psychisme (et dites de ce fait « psychoactives » ou « psychotropes ») dont l'usage est réputé donner lieu à dépendance et déchéance, et dont l'utilisation est prohibée en raison de leur dangerosité singulière (sauf exceptions de médicaments bénéficiant d'une indication médicale, notamment dans le traitement de la douleur, telle la morphine, ou dans le traitement par substitution des toxicomanes aux opiacés, telle la méthadone).
La distinction puise ses sources à la fin du XIXe siècle, lorsque fut stigmatisée la notion d'usage « voluptueux » des psychotropes, en l'espèce d'opium fumable avant tout, mais aussi de morphine injectable ou de cocaïne. De cette époque datent les prémices d'une réprobation sociale, alors que la banalisation de l'utilisation des psychotropes dans les milieux artistiques, intellectuels et médicaux commençait à faire naître des interrogations sur leur toxicité. La problématique spécifique de la toxicomanie vint alors entacher péjorativement le terme de « drogue » et introduisit une rupture dans le rapport singulier de l'homme aux psychotropes.

B. Classification

La classification des psychotropes actuelle fut introduite dans les années 1950 par Jean Delay (1907-1987) et Pierre Deniker (1916-1998) puis validée en 1961. Ces psychiatres distinguèrent, selon leur activité sur le système nerveux central, trois catégories de substances psychoactives :
- des substances sédatives ou psycholeptiques (hypnotiques, neuroleptiques, anxiolytiques) ;
- des substances excitantes ou psychoanaleptiques (amphétamines, café, thé, antidépresseurs) ;
- des substances perturbant l'activité psychique ou psychodysleptiques, groupant les hallucinogènes.

Cette classification, conçue à l'usage d'une médecine qui, à l'époque, découvrait les premiers médicaments actifs sur la dépression nerveuse (antidépresseurs), les psychoses (neuroleptiques) ou l'anxiété (tranquillisants) n'incluait que les psychotropes susceptibles de donner lieu à usage médical (divers hallucinogènes étaient

alors administrés en thérapeutique) et non les « drogues ». Elle ne mentionnait initialement ni l'alcool (introduit plus tardivement dans le groupe des psychodysleptiques) ni le tabac (qui en est demeuré exclu compte tenu de sa faible action sur le système nerveux central, selon des connaissances qui prévalurent jusque dans les années 1980).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a proposé en 1971 une classification reposant sur le pouvoir addictif de chaque drogue ainsi que sur sa capacité à induire une tolérance. Cette classification, qui donna lieu à controverse, est aujourd'hui jugée obsolète. Par exemple, la cocaïne y était considérée comme susceptible d'induire une faible dépendance psychique et aucune dépendance physique ou tolérance. De plus, cette classification n'intégrait pas le tabac ni les tranquillisants.

Le rapport remis en 1998 au gouvernement par le professeur Bernard Roques est venu rappeler la toxicité individuelle (tabac, alcool) et sociale (alcool) des drogues légales. La distinction entre drogues licites et drogues illicites n'a pas raison d'être au regard du pharmacologue ou du clinicien. Il semble plus pertinent d'établir une distinction entre les modes de consommation (usage, usage abusif, dépendance) et les risques que fait encourir cette consommation. Certains de ces paramètres font relever le consommateur d'un dispositif de soin, alors que d'autres situations ne posent pas de problèmes psychiques, physiques ou sociaux spécifiques.

Pour autant, le droit distingue deux groupes de substances soumises au contrôle de l'Organisation des Nations unies (ONU) : les stupéfiants, soumis au régime de la Convention unique de 1961, et les psychotropes médicamenteux, soumis à la convention de Vienne de 1971.

Les « stupéfiants » constituent aujourd'hui, au sens juridique, un ensemble de produits des plus variables quant à leur structure, leurs propriétés pharmacologiques ou leur capacité à induire une pharmacodépendance. Les critères officiels de classement d'une substance comme stupéfiante reposent sur des considérations de deux ordres : son potentiel à induire un usage toxicomaniaque et les dangers qu'elle représente pour la santé publique.

La Convention unique de 1961 a établi quatre listes de produits soumis à réglementation selon les avis des experts de la commission des stupéfiants de l'OMS :

- les deux premières, dites listes I et II, regroupent les stupéfiants visés par les réglementations internationales :
  - les substances classées sur la liste I sont, grosso modo, toutes celles susceptibles d'induire une toxicomanie d'une puissance comparable à celle de la morphine (et en tout cas supérieure à celle de la codéine) ou un risque d'abus comparable à celui que présente le cannabis, le haschisch ou la cocaïne ;
  - une substance classée sur la liste II est susceptible d'engendrer une toxicomanie d'une façon égale ou moindre que celle de la codéine, et au moins aussi marquée que celle du dextropropoxyphène ;
- la liste III regroupe des médicaments contenant une ou plusieurs substances des listes I et II mais à des doses si faibles qu'elles ne peuvent donner lieu à toxicomanie ou présentés de façon telle qu'il soit impossible d'en extraire les stupéfiants afin d'en user dans une perspective non médicale : ces médicaments bénéficient d'une exemption. Cela explique, pour prendre un exemple, qu'il soit possible de se procurer, sans ordonnance, des spécialités contenant de la codéine dans le cadre du traitement symptomatique de la toux ;

Tableau 1. Facteurs de risques pharmacologiques et sociaux des psychotropes (d'après le rapport Roques, 1998)

	Morphine, héroïne, autres agonistes opiacés	Cocaïne, crack	Ecstasy	Amphétamines	Alcool	Benzodiazépines (*)	Cannabis	Tabac
Activation des circuits dopaminergiques de « récompense »	+++	++++	+++	++++	+	+/–	+	+
Établissement d'une hypersensibilité à la dopamine	++	+++	?	+++	+/–	?	+/–	?
Activation des récepteurs aux opiacés	++++	++	?	+	++	+	+/–	+/–
Dépendance physique	Très forte	Faible	Très faible	Faible	Très forte	Moyenne	Faible	Forte
Dépendance psychique	Très forte	Forte mais intermittente	?	Moyenne	Très forte	Forte	Faible	Très forte
Neurotoxicité	Faible	Forte	Très forte ?	Forte	Forte	0	0	0
Toxicité générale	Forte, sauf contrôle thérapeutique	Forte	Éventuellement très forte	Forte	Forte	Très faible	Très faible	Très forte (cancer)
Dangerosité sociale	Très forte	Très forte	Faible (?)	Faible en général	Forte	Faible (sauf altération de la vigilance et création d'un état d'hyper-suggestibilité)	Faible (sauf altération de la vigilance)	0
Possibilité de traitement de substitution	Oui	Non	Non	Non	Non	Non recherché	Non recherché	Oui

(*) Les benzodiazépines forment le groupe le plus important des tranquillisants actuellement prescrits.

- la liste IV regroupe des stupéfiants considérés selon les experts de l'OMS comme toxiques et dénués d'intérêt thérapeutique (héroïne et cannabis).

La France ayant ratifié la Convention unique de 1961, elle est soumise aux dispositions du droit international pour l'ensemble des stupéfiants visés par les listes I et II de cette convention. Elle peut de plus classer comme stupéfiants dans son droit interne des substances non visées par les textes internationaux selon le principe d'indépendance du droit national. Le droit français ne définit d'ailleurs pas la notion de stupéfiant.

C. Notion de pharmacodépendance

Après avoir tenté de définir dans les années 1950 le concept de toxicomanie, l'OMS a recommandé dans les années 1960 d'abandonner cette notion peu opérante pour la remplacer par la notion de « dépendance ».

En 1969, cet organisme a proposé une définition de la « pharmacodépendance » : « *Un état psychique et quelquefois également physique résultant de l'interaction entre un organisme vivant et une drogue, se caractérisant par des modifications de comportement et par d'autres réactions, qui comprennent toujours une pulsion à prendre le produit de façon continue ou périodique afin de retrouver ses effets psychiques et quelquefois d'éviter le malaise de la privation* [du manque, NDLR]. *Cet état peut s'accompagner ou non de tolérance. Un même individu peut être dépendant de plusieurs produits.* »

Cette définition, globalisante, prend en compte la notion de dépendance psychique (autrefois appelée accoutumance), de dépendance physique et de tolérance :

- la dépendance psychique est un état mental caractérisé par une impulsion qui requiert l'usage périodique ou continu d'une drogue dans le but de créer un plaisir ou d'annuler une tension ;
- la dépendance physique correspond à une exigence de l'organisme nécessitant, pour conserver son équilibre, l'apport régulier d'une substance chimique exogène. Cette dépendance se manifeste à travers les symptômes physiques survenant lors du sevrage et par la tolérance ;
- la tolérance est le processus d'adaptation d'un organisme à une substance qui se traduit par l'affaiblissement progressif des effets de celle-ci, et qui entraîne la nécessité d'augmenter la dose pour obtenir les mêmes effets.

Cette définition a le mérite d'intégrer toute substance pharmacologiquement active et non seulement les substances déclarées illégales.

II. Toxicomanies pour le pharmacologue

Quelle que soit la drogue susceptible de donner lieu à pharmacodépendance envisagée, son administration aboutit *in fine* à l'augmentation d'activité des neurones dopaminergiques du cerveau, donc globalement à une exacerbation de la transmission mettant en jeu ces neurones. Les neurones dopaminergiques, impliqués dans la genèse et le contrôle des émotions, représentent ainsi une voie finale commune

à l'action de la plupart des drogues. Cette convergence de l'effet des différents produits addictifs sur le système dopaminergique explique les sensations, en particulier le plaisir, éprouvées lors de la prise de drogue ; l'intervention de ce système dans les effets hédonistes des drogues n'est cependant pas exclusive : même si la plupart des produits agissent majoritairement (psychostimulants comme la cocaïne, les amphétamines ou l'ecstasy, alcool), voire sélectivement (opiacés tels que la morphine ou l'héroïne, nicotine du tabac, cannabis) sur ces neurones, d'autres ensembles neuronaux sont également mis en jeu.

Les stimuli qui activent les neurones dopaminergiques ont une valeur émotive et affective (plaisir, mais également douleur, stress) acquise au cours du développement et de l'histoire de l'individu, probablement par l'habitude ou l'apprentissage. L'information reçue par ces neurones résulte donc d'un traitement qui se réalise non seulement à travers l'intégration élaborée de l'événement immédiat, mais également en référence à toutes les informations qui ont pu s'accumuler au cours du développement. La régulation de la réactivité des neurones dopaminergiques s'est mise en place en fonction de l'environnement que l'individu a rencontré au cours de son développement, selon des processus qui lui sont propres et qu'il a successivement utilisés pour répondre à cet environnement.

Là réside probablement l'explication des vulnérabilités individuelles vis-à-vis de la drogue, puisqu'il semble en effet admis que des situations anxiogènes suffisamment précoces et intenses, et l'exposition à des événements stressants (pressions d'ordre social, économique et/ou familial…) à des périodes critiques de la vie sont des facteurs qui peuvent prédisposer à la toxicomanie. Il n'est pas exclu que les activités de tout individu aient pour but *in fine* de maintenir un équilibre harmonieux entre ses différents systèmes dopaminergiques, et que la drogue soit une voie pharmacologique permettant d'atténuer l'effort que nécessite une interaction avec l'environnement.

S'il fallait privilégier parmi les différents critères caractérisant une drogue celui susceptible d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de la toxicomanie, ce serait sans conteste celui de sensibilisation qui devrait être choisi. L'installation de la sensibilisation dépend en effet à la fois de la prise répétée de drogue et de l'environnement qui lui est associé, et pourrait bien représenter la voie de la dépendance psychique, responsable du besoin compulsif de consommer le ou les produits. L'intérêt des processus de sensibilisation vient également de ce qu'ils peuvent être appréhendés comme des modèles expérimentaux permettant d'analyser les circonstances et les mécanismes d'émergence des pathologies (comportements paranoïaques, psychoses) engendrées chez l'homme par les drogues. En outre, il est probable qu'un organisme qui a développé la capacité de créer de fortes variations d'activités de certains de ses circuits neuronaux devienne dépendant de ses propres aptitudes. Enfin, l'existence de sensibilisations croisées entre le stress, les psychostimulants et les opiacés montre non seulement l'existence d'un tronc commun entre ces différentes composantes (les neurones dopaminergiques) mais permet également de mieux comprendre pourquoi les toxicomanes peuvent passer sans difficulté d'un produit à l'autre.

La compréhension des mécanismes neurobiologiques de la toxicomanie permet de comprendre l'intérêt des stratégies thérapeutiques mises en œuvre dans le traitement de la dépendance et la prévention des rechutes (cf. l'intérêt de la clonidine

dans le traitement des symptômes de sevrage aux opiacés). Par ailleurs, puisque le système dopaminergique semble jouer un rôle clé dans la dépendance psychique et les propriétés addictives des drogues, l'emploi d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques a été tenté à de nombreuses reprises chez l'homme, avec un succès toutefois relatif – probablement en raison du manque de sélectivité des molécules employées et parce que d'autres systèmes de neurotransmission sont impliqués (sensibilisés). En matière de substitution, le traitement par la méthadone s'appuie sur les propriétés d'agoniste de cette molécule vis-à-vis des récepteurs aux endorphines et sur sa cinétique d'action particulièrement lente. Ces propriétés entraînent de fait une réduction notable des prises d'opiacé (héroïne) par le toxicomane et contribuent, grâce au strict contrôle en milieu hospitalier de ces prises et grâce à un suivi affectif et psychologique adapté, à la réinsertion sociale de la personne.

III. Cannabis et dérivés

Le cannabis est une plante dicotylédone (ordre des Urticales, famille des Cannabinacées, proche de celle des Urticacées), herbacée, pouvant atteindre 2 à 4 mètres lorsque les conditions sont favorables. Après fécondation, les fleurs livrent chacune un akène ovoïde, lisse, brun à gris luisant. Ces graines constituent le chènevis. Le chanvre est généralement dioïque : il existe des pieds mâles et des pieds femelles distincts. Les premiers se distinguent des seconds par leur taille plus petite et leur aspect plus grêle. Il existe toutefois des variétés sélectionnées monoïques qui portent les fleurs mâles et femelles sur un même pied, comme la plupart des végétaux.
La plupart des botanistes considèrent qu'il n'existe qu'une espèce de cannabis, *Cannabis sativa L.*, possédant de nombreuses variétés géographiques et chimiques. Cette plante est connue populairement sous le nom de « chanvre ».
Cannabis sativa existe sous de nombreuses formes différant par leur morphologie aussi bien que par la durée de leur cycle végétatif ou par leur composition chimique qualitative et quantitative en cannabinoïdes. Elles sont groupées, du point de vue de leurs utilisations, en deux ensembles :
- les variétés à fibre ou « textiles » ;
- les variétés communément désignées comme chanvre « indien » : elles produisent une sécrétion ou « résine », au niveau des inflorescences femelles, se présentant comme de fins cristaux adhérant notamment aux inflorescences et aux feuilles supérieures. Cette résine est riche en substances chimiques de la famille des cannabinoïdes. Les pieds femelles livrent plus de résine que les pieds mâles.

La différence entre ces deux formes de cannabis n'est pas tranchée sur le plan botanique. Il existe des variétés intermédiaires. La teneur en tétrahydrocannabinol (THC), le principe actif du cannabis, constitue un critère de sélection fondamental. La limite légale, en France, en est fixée à 0,3 % de la matière sèche. Cette limite est désormais reprise dans les textes européens. Certaines variétés industrielles d'obtention moderne (années 1960-1970) contiennent moins de 0,01 % en principe inébriant.

A. Préparations à base de cannabis

1. Feuilles et sommités fleuries

Simplement séchées et pulvérisées, elles se présentent sous la forme d'un produit contenant des graines (herbe, beuh) ou non (*sinsemilla*), titrant environ 2 à 4 % de THC en proportion de matière sèche, parfois plus s'il s'agit de variétés spécialement sélectionnées par les producteurs clandestins (Hollande, Angleterre, États-Unis, Europe de l'Est). L'herbe est généralement mélangée à du tabac et roulée sous forme de cigarettes artisanales (cône, pétard, tarpé, etc.).

2. Résine

Produite par la plante de cannabis, elle constitue quant à elle la base de la préparation du haschisch (*charas* en Inde, *chocolate* en Espagne, *shit*, ou *teuch* par abréviation de « teuchi », *shit* en verlan, *chichon* chez les adolescents), qui titre de 2 à 20 % en THC.
Le haschisch entre dans la composition de préparations généralement destinées à être fumées. Il est le plus souvent émietté sur du tabac après avoir été chauffé à la flamme d'un briquet pour le rendre friable, et roulé sous forme de joint ou de cône.

3. Huile de cannabis

C'est une préparation liquide obtenue à partir de cannabis, particulièrement concentrée en cannabinoïdes. Il s'agit d'un liquide visqueux, verdâtre à noir selon l'origine, d'odeur vireuse caractéristique, titrant jusqu'à 60 % en THC. On l'utilise dans les pays occidentaux mélangé à du tabac, par inhalation, dans des joints. C'est une forme d'usage relativement rare. Cette préparation ne doit pas être confondue avec l'huile alimentaire de cannabis commercialisée dans certains magasins de diététique.

B. Action pharmacologique du cannabis

L'action pharmacologique essentielle du cannabis est induite par les cannabinoïdes (des dérivés terpéniques) contenus dans la résine : les cannabinoïdes englobent de nombreuses substances chimiques apparentées : cannabinol, cannabidiol, cannabigérol, cannabivarine, cannabicyclol et Δ^9-tétrahydrocannabinol (THC).
Le principe actif majeur du cannabis responsable de ses effets psychotropes (euphorie, apathie, modifications des perceptions sensorielles et du temps vécu, etc.) et de son action analgésique est le THC, produit classé comme stupéfiant. Certains autres composés dérivés (dont les produits résultant de son métabolisme hépatique) ont également une activité psychotrope, toutefois moindre.
Les cannabinoïdes exercent leurs effets pharmacologiques notamment (mais non exclusivement) en se fixant à des récepteurs spécifiques dont deux types ont été mis en évidence depuis le début des années 1990. Le récepteur CB1 est localisé essentiellement dans le cerveau, et le récepteur CB2, quant à lui, est localisé uniquement dans des tissus périphériques (en particulier la rate).

Dans le cerveau, les récepteurs CB1 sont concentrés dans différentes structures du système limbique et jouent à ce titre un rôle majeur dans la régulation des émotions. Leur abondance ainsi que leurs interactions à ce niveau avec la dopamine expliquent en partie les propriétés hédonistes et euphorisantes du cannabis.
Les troubles de la mémoire et cognitifs engendrés par la prise chronique de cannabis pourraient quant à eux être liés à la présence de récepteurs CB1 dans le cortex et surtout dans l'hippocampe, structure cérébrale jouant un rôle clé dans les processus de mémorisation.
Enfin, la présence de récepteurs dans le thalamus, relais des informations sensorielles d'origine périphérique, est probablement en rapport avec la modification des perceptions sensorielles souvent évoquée par les usagers de cannabis.
La mise en évidence de ces récepteurs cérébraux a rapidement suggéré la présence au sein du cerveau de « cannabinoïdes » endogènes. Le ou les neuromédiateurs intervenant dans ces systèmes n'ont cependant pas encore été clairement déterminés. Il pourrait s'agir de l'anandamide (du sanscrit *ananda* signifiant « félicité, béatitude »), isolée et identifiée en 1992, un dérivé d'un acide gras, l'acide arachidonique, présent en quantité importante dans la plupart des cellules du cerveau et dont la fonction physiologique demeure mal élucidée. La mise en évidence d'un autre ligand endogène potentiel des récepteurs aux cannabinoïdes, le 2-AG (2-arachidonylglycérol), suggère l'existence d'autres cannabinoïdes endogènes.

C. Conséquences cliniques de l'usage du cannabis

1. Manifestations psychiques

Il existe un consensus quant à l'existence éventuelle de troubles aigus d'allure psychotique après usage de fortes doses de drogue ou chez des sujets prédisposés. De même, des manifestations plus durables peuvent s'observer lors d'une consommation prolongée, et l'usage de cannabis peut précipiter la décompensation d'une pathologie psychique préexistante. En revanche, une contradiction oppose toujours deux écoles :

- pour l'une, l'usage de cannabis peut induire, à lui seul, une schizophrénie ;
- pour l'autre, les signes, transitoires, ne correspondent pas à la définition actuelle de la schizophrénie ; les schizophrénies décrites chez les usagers de cannabis préexistaient d'une façon plus ou moins fruste.

Les effets psychiques ne sont manifestes qu'à partir de la dose de 3 mg chez un adulte. Lorsque celle-ci excède 15 à 20 mg, des troubles d'allure psychotique peuvent survenir. Néanmoins, certains auteurs admettent un seuil beaucoup plus bas.

a) Usage occasionnel

Les signes de l'intoxication aiguë au cannabis, souvent frustes, varient selon l'usager, le contexte et la quantité de produit consommée. On retrouve de façon théorique lors de l'« ivresse cannabique » :

- des troubles du cours de la pensée, avec désorientation temporelle, troubles mnésiques, troubles de la vigilance (l'usage de cannabis avant de prendre le volant présente un risque réel car il amoindrit la vigilance), perturbations de la libido ;

- des altérations sensorielles (vision, ouïe, odorat, goût, schéma corporel), des troubles de l'équilibre et de la coordination des mouvements ;
- des troubles thymiques et dissociatifs, avec euphorie, dysphorie, anxiété, agressivité, dépersonnalisation, hallucinations, délire : au total, un comportement inadapté.

L'évolution est brève et l'intoxication régresse sans séquelles. Les remémorations du vécu oniroïde sont fréquentes chez des sujets imaginatifs. Les manifestations cliniques sont très polymorphes.

L'intoxication est inaugurée par un sentiment de bien-être avec euphorie, loquacité, rires inadaptés, ou parfois, au contraire, sédation, voire léthargie, manque de mémoire, difficultés à effectuer des opérations mentales complexes, modifications sensorielles, diminution des performances motrices et sentiment subtil de ralentissement de l'écoulement du temps et de modification de la perception des sons. Sensations vertigineuses, nausées, bouffées de chaleur peuvent accompagner ces sensations. Dépersonnalisation et déréalisation peuvent survenir, mais les hallucinations demeurent exceptionnelles.

La décompensation psychotique liée au cannabis, rare, est caractérisée par un syndrome délirant organique, souvent à thème de persécution, survenant rapidement, avec anxiété, labilité émotionnelle, dépersonnalisation, amnésie, et symptomatologie physique fruste (tremblements, incoordination motrice, etc.). Ces signes s'abolissent souvent en une journée, rarement plus.

Les épisodes de flash-back (un flash-back consiste à revivre une expérience sous hallucinogènes à distance de tout usage du produit) demeurent très rares et leur corrélation à l'usage isolé de cannabis reste incertaine.

Les signes d'intoxication aiguë cèdent rapidement à l'administration d'anxiolytiques, voire à celle d'antipsychotiques sédatifs (par exemple, cyamémazine, Tercian®).

b) Usage fréquent et prolongé

■ *Action sur la mémoire*

Un usage régulier de cannabis, même sur une courte période, induit des perturbations de la mémoire immédiate, troubles pouvant persister après quelques semaines d'abstinence. Cette conséquence de la consommation de drogue est sans doute potentialisée par l'association fréquente à l'alcool. Elle serait dose-dépendante et aussi importante que celle décrite avec l'alcool ou les tranquillisants.

■ *Crise d'angoisse aiguë (attaque de panique)*

L'intoxication cannabique semble pouvoir, de façon exceptionnelle, induire des attaques de panique, chez des sujets présentant un contexte d'anxiété chronique. Les conditions d'environnement sont déterminantes.

■ *Syndrome « amotivationnel »*

Le syndrome amotivationnel associe un désinvestissement des activités quotidiennes à un déficit mnésique avec émoussement affectif et intellectuel. Il concerne souvent l'adolescent, indépendamment de tout usage de cannabis, que l'on voit constamment replié sur lui-même et sur son songe intérieur, d'humeur changeante, morose, souvent marginalisé. L'adolescent en proie à ce syndrome traduit ses errements dans sa quête d'identité.

■ *Psychose cannabique*

Les travaux consacrés aux « psychoses » induites par le cannabis permettent d'établir une distinction entre trois états pathologiques différents : le syndrome confusionnel aigu, le syndrome schizophréniforme et le trouble d'allure psychotique chronique.

Syndrome confusionnel aigu

Il est identique à celui décrit lors d'un usage isolé de cannabis, avec altérations sensorielles (distorsions visuelles ou cénesthésiques, plus qu'auditives, parfois hallucinations), troubles de la mémoire des faits récents, idées délirantes à thème de persécution, incontinence émotionnelle et affective, labilité de l'humeur, irritabilité et agressivité, l'ensemble survenant rapidement et sans prodromes. Ce tableau ne s'observe que chez des sujets consommant une forte dose de drogue pendant une période prolongée. L'évolution spontanée est très favorable en quelques jours à un mois. Le traitement est purement symptomatique (anxiolytiques, neuroleptiques).

Syndrome schizophréniforme

Ce syndrome a pour caractéristique un vécu paranoïde, avec idées de persécution et sentiment d'hostilité de l'entourage engendrant une méfiance et une attitude défensive. Plus rarement, il s'accompagne d'illusions, voire d'hallucinations, de passages à l'acte agressifs sous-tendus par la sensitivité pathologique et favorisés par la labilité de l'humeur. L'examen ne permet pas de retrouver de troubles de la conscience ni de l'attention. Les fonctions cognitives et mnésiques sont intactes. Il n'existe pas, en règle générale, de troubles du cours de la pensée comme dans la schizophrénie : il n'y a ni discordance ni dissociation. La récupération est rapide.
Ici encore, un usage de doses élevées de cannabis sur une période prolongée s'avère précéder la survenue des troubles. Il n'y a pas de consensus quant à un prérequis psychopathologique à la survenue de ces troubles. De même, on ne sait s'il s'agit de véritables psychoses cannabiques, bien individualisées, ou de psychoses identiques au modèle commun à toutes les psychoses.

Trouble d'allure psychotique chronique

Dans le cas de troubles psychotiques chroniques, la symptomatologie est durable et variable dans son expression : le plus souvent, la clinique est insidieuse (négligence de soi, distractibilité et léthargie, associés à un appauvrissement intellectuel avec troubles de l'attention, de la concentration et de la mémoire) mais on retrouve parfois des manifestations cliniques bruyantes, paranoïaques ou mégalomaniaques avec idées délirantes de persécution ou de grandeur générant des troubles du comportement, des passages à l'acte violents. L'ensemble évolue de manière cyclique sur des mois ou des années avec une rythmicité variable.

c) Effets de la consommation de cannabis sur des pathologies psychiatriques confirmées

Il semble que l'utilisation du cannabis à forte dose par des schizophrènes puisse atténuer les symptômes déficitaires de la maladie (dépression), ce qui conforte l'hypothèse d'une « automédication » par cette drogue. Les psychotiques chroniques recourant au cannabis cherchent son aspect socialisateur, anxiolytique et paradoxalement psychostimulant.

On ne connaît guère dans le détail les conséquences de l'usage du cannabis sur une psychose constituée. Il semble acquis qu'il puisse assombrir, lorsqu'il est employé à haute dose et sur une longue période, le cours de la maladie en en aggravant les symptômes (hospitalisations plus fréquentes) et en modifiant l'équilibre thérapeutique (perturbations pharmacocinétiques et pharmacologiques de l'action des antipsychotiques, mais aussi diminution de l'observance du traitement, diminution de la compliance aux programmes de réhabilitation et de réinsertion). De même, il semble que certains des patients psychotiques utilisant du cannabis soient plus agressifs que la population d'usagers de référence. L'usage de cannabis paraît accentuer l'inhibition psychomotrice des sujets souffrant de dépression.

2. Manifestations somatiques

La toxicité aiguë du cannabis est faible : la notion de dose « mortelle » ou d'« overdose » n'existe pas. Il n'existe pas de manifestations somatiques susceptibles de mettre l'usager en péril.

- *Appareil digestif.* Les signes, spontanément résolutifs, apparaissent lorsque le cannabis est consommé par voie orale : crampes et douleurs gastriques, sensation de ballonnement, troubles du transit ; rares signes hépatiques.
- *Appareil respiratoire.* Les effets, d'ordre allergique (asthme, bronchoconstriction, irritation avec toux, etc.), découlent du fait même de fumer et des substances de coupe du haschisch (les cannabinoïdes sont en eux-mêmes des bronchodilatateurs et tendent plutôt, sur le plan pharmacologique, à lever le spasme bronchique).
- *Fonction cardiaque.* Les modifications du rythme sont inconstantes et variables ; elles peuvent exposer à des risques de troubles du rythme chez des sujets insuffisants cardiaques consommant de fortes quantités de cannabinoïdes.
- *Réactions allergiques.* Elles demeurent rares, et le plus souvent induites par des contaminants de la préparation (moisissures du haschisch). Les effets découlant d'un usage fréquent et prolongé sont également limités par rapport à d'autres drogues ; l'association au tabac potentialise la toxicité chronique de cette drogue.
- *Appareil respiratoire.* Associé au tabac pour être fumé, l'usage de cannabis sous cette forme induit des altérations fonctionnelles des voies respiratoires, affectant préférentiellement les bronches (enrouement persistant, toux, bronchites à répétition, BPCO). La combustion du haschisch libère des goudrons plus toxiques que ceux du tabac. Tout comme le tabac, un usage prolongé de cannabis diminue la capacité oxyphorique du sang, c'est-à-dire sa capacité à transporter l'oxygène vers les tissus.
- *Fonctions immunitaires.* Les données demeurent controversées. À des doses importantes, supérieures à celles généralement utilisées par les usagers, les cannabinoïdes perturbent le système immunitaire. Il est probable qu'ils agissent sur les récepteurs CB2 périphériques (organes lymphoïdes, lymphocytes, macrophages, etc.). Cela laisse à penser qu'ils fragiliseraient le système immunitaire, rendant l'organisme plus vulnérable aux infections. Toutefois, des travaux sont venus partiellement infirmer ces observations. La parenté chimique entre l'anandamide et divers médiateurs physiologiques impliqués dans la réaction immuni-

taire (prostaglandines, cytokines, etc.) doit inciter à poursuivre les observations. Sur le plan clinique, aucune aggravation du statut immunitaire des patients cancéreux ou sidéens consommant du cannabis (pratique autorisée dans certains pays où le THC a le statut de médicament indiqué dans le traitement de la douleur et de l'anorexie ou la prévention des nausées et vomissements) n'a pu être mise en évidence.

- *Fonctions endocrines.* Sur modèle animal, le THC comme l'anandamide diminuent les concentrations plasmatiques de la LH et de la testostérone. Ils stimulent la sécrétion d'ACTH et celle de corticostérone. Le THC agit aussi au niveau des neurones de l'hypothalamus. Si l'administration de THC réduit la taille de certains organes impliqués dans la sexualité chez l'animal, les observations conduites chez l'homme restent contradictoires. L'OMS rappelle, dans son rapport de 1997, qu'aucune étude épidémiologique n'a confirmé une action significative du THC sur les fonctions testiculaires. Par contre, des considérations pharmacologiques complexes conduisent les scientifiques à s'interroger sur un éventuel effet négatif des cannabinoïdes sur la phase d'implantation de l'embryon. Toutefois, un recul de trente ans aux États-Unis depuis le début de la consommation massive de cannabis n'a pas permis de prouver que la drogue induisait une baisse de la fertilité.
- *Spermatogenèse.* Une consommation de quantités importantes de cannabis (4 à 20 « joints » quotidiennement pendant quatre semaines) induirait une diminution significative de la concentration du sperme en spermatozoïdes, avec diminution concomitante de la mobilité et augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux. Il pourrait s'agir d'une action directe des cannabinoïdes sur l'épithélium germinal au cours de la spermatogenèse. Les conséquences cliniques de cette anomalie n'ont pu être évaluées à ce jour.
- *Pouvoir cancérogène.* La fumée des cigarettes de cannabis contient de nombreuses substances toxiques (naphtylamines, nitrosamines, benzène, benzanthracène, benzopyrènes). Cette fumée s'est révélée carcinogène à l'égard de cultures cellulaires. Les cannabinoïdes inhibent in vitro l'incorporation de précurseurs des macromolécules (ADN, ARN, protéines) dans les lymphocytes stimulés par des mitogènes, probablement en modifiant la structure membranaire de la cellule. La participation du cannabis, utilisé de façon importante, au développement précoce de cancers des voies respiratoires est aujourd'hui acquise.

D. Dépendance et tolérance au cannabis

1. Tolérance

Le développement d'une tolérance lors de la consommation de cannabis a donné lieu à une controverse, qui n'est d'ailleurs pas close car divers phénomènes se conjuguent : habileté de l'usager à inhaler plus intensément le produit, induction enzymatique diminuant les taux de THC mais augmentant ceux de son métabolite actif (11-hydroxy-THC) diminution de la sensibilité des récepteurs aux cannabinoïdes. On considère qu'une tolérance au cannabis se développe lors d'un usage chronique prolongé, et ce d'autant que les variétés utilisées sont concentrées en

THC. Pour autant elle demeure quantitativement faible. Elle est croisée avec l'alcool, les tranquillisants mais aussi les morphiniques.

2. Dépendance

L'arrêt brutal d'une consommation chronique de cannabis induit des signes de sevrage. Ils surviennent environ 12 à 24 heures après la dernière prise (compte tenu de la rémanence importante du THC dans l'organisme dont la demi-vie est proche de huit à dix jours), pour s'intensifier pendant un à deux jours avant de disparaître spontanément en trois à cinq jours. Ces signes se caractérisent par de l'anxiété, de l'irritabilité, de l'agitation, des insomnies, de l'anorexie, et une altération transitoire de l'état général dans un syndrome pouvant rappeler un épisode grippal. L'ensemble évoque les signes de sevrage au décours d'un usage prolongé de benzodiazépines.
En revanche, il n'y a généralement pas de signes spécifiques succédant à l'arrêt d'une consommation modérée de cannabis.

IV. Opiacés

Les opiacés sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique dont les effets au niveau de la cellule sont transmis par des récepteurs spécifiques, dits récepteurs aux opiacés (ou opiorécepteurs). Leur action est agoniste ou antagoniste de celle du produit référent du groupe, la morphine, un alcaloïde isolé du latex du pavot indien, l'opium. Outre celle-ci, l'héroïne, la codéine, la méthadone, la buprénorphine, la nalorphine, la naloxone, la naltrexone comptent au nombre des opiacés utilisés par les toxicomanes ou administrés en thérapeutique dans le cadre de traitements (intoxication aiguë ou overdose, substitution, selon les molécules et leurs propriétés pharmacologiques).

A. Morphine

1. Pharmacologie

Les propriétés pharmacologiques de la morphine sont caractéristiques de celles de tous les agonistes opiacés : héroïne, codéine, méthadone, dextromoramide, etc. Les propriétés pharmacologiques d'opiacés antagonistes (nalorphine, naloxone, naltrexone) ou agonistes-antagonistes mixtes (buprénorphine) en diffèrent sensiblement.
La morphine agit comme les endorphines en se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques (opiorécepteurs). Ces récepteurs sont distingués selon trois sous-types : récepteurs μ, sur lesquels se fixent surtout les β-endorphines, récepteurs κ, sur lesquels agit la dynorphine A, et récepteurs δ, sur lesquels se fixent les β-endorphines et les enképhalines. L'action de la morphine sur les récepteurs est

dose-dépendante avec un seuil maximal correspondant à la saturation de tous les récepteurs.
La morphine agit dans le système nerveux plus particulièrement sur le mésencéphale, le bulbe rachidien et la corne postérieure de la moelle épinière. Ses effets pharmacologiques ont notamment des conséquences sur trois grands systèmes physiologiques : le système nerveux central, le système gastro-intestinal et le système cardiovasculaire.

2. Clinique

Au niveau du système nerveux central, la morphine provoque une antalgie par une augmentation du seuil de perception de la douleur, en inhibant la libération de la substance P (neuromédiateur spécifique des voies nerveuses contrôlant les sensations douloureuses) et en activant les systèmes inhibiteurs qui bloquent l'action des neurones de la douleur (voies ascendantes de la douleur). La morphine provoque donc un état d'indifférence aux stimuli douloureux, lié à son activité sur les récepteurs μ, κ et δ.
D'autres effets ont aussi pour origine le système nerveux central, mais sont plutôt considérés comme des effets indésirables. Un myosis, dû à l'activation des récepteurs μ et κ, s'observe chez presque tous les toxicomanes aux opiacés (une mydriase signifie quant à elle un état de manque ou, surtout, une overdose). Une dépression respiratoire, avec diminution de la fréquence et de l'amplitude des mouvements, est reliée à une action sur les récepteurs μ et δ : elle résulte d'une réduction de la sensibilité des centres respiratoires vis-à-vis d'une augmentation de la teneur en gaz carbonique du sang. Cette dépression est la cause essentielle des décès par intoxication aiguë (overdose). Une inhibition de la toux et l'apparition de nausées ou de vomissements sont signalées lors de l'administration de morphine, même à faible dose. L'action émétisante disparaît avec l'accoutumance. Selon les doses, la morphine peut provoquer l'apparition d'un état d'euphorie, voire d'une dysphorie, par action sur les récepteurs μ et κ : ce sont les effets recherchés par les toxicomanes. À forte dose, la morphine induit des convulsions, notamment chez les individus ayant des antécédents d'épilepsie.
L'action de la morphine sur les récepteurs μ du système gastro-intestinal provoque une diminution du tonus et du péristaltisme des fibres longitudinales alors qu'elle augmente le tonus des fibres circulaires. Ce mécanisme est à l'origine d'une importante constipation. L'action de la morphine explique également une augmentation de la pression dans les canaux biliaires pouvant être à l'origine de coliques hépatiques.
Au niveau cardiovasculaire, la morphine entraîne une dilatation des veines et des artères et peut provoquer une hypotension orthostatique.
La morphine a d'autres effets pharmacologiques de moindre importance : elle induit un spasme des voies urinaires, une vasodilatation cutanée, une chute du taux d'hormones hypophysaires (LH, FSH), une augmentation du taux plasmatique de la prolactine et de l'hormone de croissance. Comme tous les opiacés, la morphine franchit la barrière placentaire (ce qui explique les conséquences péjoratives sur le fœtus des phases de manque et d'intoxication de la femme héroïnomane enceinte et la naissance d'enfants physiquement dépendants des opiacés) et passe dans le lait maternel.

3. Tolérance et dépendance

L'administration répétée de morphine peut entraîner une toxicomanie caractérisée par une dépendance psychique et physique ainsi que par une tolérance : elle est donc inscrite sur la liste des stupéfiants. Ce phénomène concerne de façon inégale les diverses actions pharmacologiques du produit : s'agissant du traitement de la douleur, il impose d'augmenter régulièrement les posologies afin de conserver son efficacité au traitement. La réponse respiratoire à l'administration régulière de morphine est elle aussi sujette à tolérance. L'arrêt brutal du traitement provoque un syndrome de sevrage et doit se faire progressivement. La dépendance n'a pas pour unique cause l'administration de morphine (ni d'ailleurs d'un autre opiacé) mais a une origine plurifactorielle (psychologique, sociale, etc.). Un patient souffrant de douleurs auquel on administre de la morphine, même à une posologie de plusieurs grammes par jour, verra ainsi se développer une tolérance (ce qui explique qu'il faille en arriver à des posologies parfois considérables) sans pour autant devenir dépendant du médicament.

B. Héroïne

L'héroïne (diacétylmorphine, diamorphine) est un dérivé de synthèse de la morphine introduit en médecine en 1898, dans le traitement de la tuberculose. La généralisation de sa prescription dans un grand nombre d'indications peu adaptées à ses propriétés pharmacologiques banalisa son usage au début du XXe siècle et fut à l'origine d'innombrables cas de toxicomanie. Son utilisation fut rapidement contrôlée de façon drastique.

1. Drogue et son usage

L'héroïne se présente comme une poudre blanche et cristalline, contenant généralement entre 2 % et 20 % de produit pur sur le marché de détail, parfois plus. Elle est utilisée de diverses façons. La plus courante demeure l'injection intraveineuse, qui expose aux risques les plus importants (action pharmacologique puissante de la drogue, toxicité des agents de coupe, risque infectieux) mais qui, seule, donne l'effet violent de *flash* recherché par les usagers. Les doses utilisées sont variables selon le degré de tolérance du sujet : il est fréquent qu'elles excèdent un gramme par jour. L'héroïne peut également être prisée (la drogue passant alors dans le sang au travers de la muqueuse nasale), fumée dans une pipe à eau, ou une pipe classique mélangée à du tabac ou à du cannabis (sous forme de vapeurs d'héroïne base). Une forme spécifique d'héroïne, appelée *tar* (« goudron » en anglais), se présente sous forme de petits morceaux pâteux de couleur noirâtre : elle est essentiellement destinée à être fumée.

2. Pharmacologie

Les propriétés pharmacologiques de l'héroïne sont comparables à celles de la morphine dont elle dérive. Étant plus liposoluble, elle agit plus vite, plus intensément mais de façon plus brève sur le système nerveux central (essentiellement composé de phospholipides). Elle est très rapidement métabolisée dans l'organisme en

monoacétylmorphine puis en morphine (lors d'une administration orale, la totalité de l'héroïne est transformée en morphine dans le foie avant même de gagner le cerveau : son administration revient dès lors à administrer de la morphine).
La forme basique de l'héroïne (équivalent de ce qu'est le crack à la cocaïne), plus lipophile que la forme salifiée, agit plus rapidement, d'une façon plus massive sur les récepteurs aux opiacés centraux et médullaires, mais d'une façon également plus fugace. En revanche, la forme salifiée (chlorhydrate) est plus hydrophile, ce qui facilite son administration par voie injectable.

C. Codéine

La codéine (ou méthylmorphine) est un alcaloïde isolé de l'opium. Elle est utilisée en médecine pour ses propriétés antitussives et analgésiques. Il s'agit d'un produit sept fois moins puissant que la morphine.
Les premiers cas de toxicomanie à la codéine (codéinomanie) furent décrits chez des patients auxquels on l'administrait par voie injectable pour traiter leur dépendance à la morphine. En fait, une dépendance survient même lors d'une utilisation par voie orale.
Son action pharmacologique et ses effets sont comparables à ceux de la morphine lorsqu'elle est injectée. Administrée par voie orale, elle développe une action analgésique plus faible mais expose à des effets indésirables qualitativement identiques : dépression respiratoire, nausées, vomissements, constipation.
L'usage de la codéine s'inscrit souvent dans le cadre d'une polytoxicomanie, mais elle sert également de drogue d'appoint chez des héroïnomanes en manque ou dans le cadre d'une tentative d'auto-substitution. Sa consommation supprime en effet rapidement les manifestations de manque et il est facile de s'en procurer puisqu'elle est vendue sans ordonnance dans les pharmacies à un prix très faible. Les usagers en absorbent souvent cinquante à cent fois la dose thérapeutique, de façon à ressentir une certaine euphorie.
Il reste difficile d'évaluer avec précision l'ampleur de la consommation de ce produit en France, mais les ventes de la principale des spécialités contenant de la codéine (Néocodion®) ont longtemps – avant la généralisation des pratiques de substitution officielle – voisiné les dix à onze millions de boîtes chaque année en France.

D. Opiacés prescrits dans le cadre des traitements de substitution

Le traitement de substitution (dit aussi traitement de maintenance) constitue une modalité de traitement neurobiologique d'un sujet pharmacodépendant reposant sur l'administration d'une substance ayant une activité pharmacologique similaire à celle de la drogue addictive. La substitution vise, en prévenant la symptomatologie psychique et physique du manque, à stabiliser la consommation de drogues illicites injectables (héroïne) ou, pour le moins, à la diminuer, à insérer le patient dans une logique de soins psychiques comme somatiques, et surtout à mettre en place un étayage psychologique et social suffisant pour éviter que le patient ne réi-

tère l'utilisation de drogue au terme de ce traitement le plus souvent très prolongé. L'objectif doit rester l'élaboration d'un projet de vie d'où la dépendance à la drogue est exclue.

La pratique d'une substitution concerne deux types de dépendance :

- le tabagisme avec usage de substituts nicotiniques, mais dans un cadre où se pose avant tout l'aliénation psychologique à la cigarette et non pas celle de la (re)socialisation du patient ;
- l'héroïnomanie, avec prescription de médicaments opiacés, où la notion médicale de substitution prend tout son sens.

Il n'existe à l'heure actuelle pas de possibilité de substitution chez les consommateurs devenus dépendants d'autres types de drogues.

L'administration d'un médicament de substitution opiacé empêche la survenue des signes du sevrage induits par l'arrêt de la consommation de l'héroïne : le patient sous médicament de substitution, si la posologie en est suffisante, se présente comme sevré. Il ne ressent plus de symptômes de manque, et ne présente pas non plus l'état de dysphorie anxieuse ou de dépression fréquemment observé au décours d'un sevrage.

Mais, également, la substitution, en réduisant ou abolissant le besoin compulsif de consommer le produit illicite et ses effets en cas de prise, a pour bénéfice une réduction de tous les risques liés à cette consommation : risque infectieux (hépatites, sida), risque judiciaire. La stabilisation du consommateur d'opiacés facilite l'instauration d'une dynamique de soins incluant l'élaboration de liens sociaux, familiaux et affectifs nouveaux.

Le traitement de substitution constitue une étape, certes parfois prolongée, de l'existence du toxicomane, qui facilite le dépistage et le traitement des complications somatiques et psychiques de la toxicomanie. De plus, le patient, affranchi du besoin pluriquotidien de drogue, peut dès lors consacrer son temps à élaborer un projet de vie et à préparer son existence au terme de la période de substitution. L'accompagnement social et médical lui permet de réaliser progressivement un étayage affectif, familial et professionnel et facilite la régularisation de ses problèmes avec la justice, les organismes sociaux et médicaux, etc. ; il est seul garant de son devenir ultérieur. La substitution permet ainsi une évolution progressive, moins brutale que celle qu'impose la cure de sevrage.

Un traitement de substitution n'a de sens que si le patient, suffisamment motivé, est prêt à accepter une abstinence, fût-elle partielle (car persiste généralement dans un premier temps au mieux une consommation de tabac, d'alcool, de médicaments, voire de cannabis ou de cocaïne), et à adhérer aux contraintes du protocole.

La substitution n'est plus désormais une manière de traitement palliatif de toxicomanes chez lesquels toutes les autres thérapeutiques ont échoué. Son indication se fonde sur une appréciation individuelle de chacun des patients, après évaluation de son degré de dépendance et d'implication dans le milieu de la toxicomanie, du contexte psychologique et somatique et de l'environnement social. Deux types de situation retiennent tout spécifiquement l'attention :

- *toxicomane souffrant d'une maladie chronique, infectieuse en général (VHC, VIH)* : le traitement de substitution permet une amélioration sensible de la prise en charge des toxicomanes séropositifs. Il constitue un facteur indirect mais déterminant de l'accès aux soins somatiques pour cette population ;

- *toxicomane enceinte* : l'introduction d'un traitement par méthadone lors d'une grossesse chez une femme héroïnomane doit être progressive. En revanche, si une grossesse survient chez une femme bénéficiant déjà d'un traitement par méthadone, la posologie est maintenue constante. Le schéma posologique est souvent revu à la hausse lors du dernier trimestre car les modifications physiologiques induites par la grossesse entraînent une diminution des taux plasmatiques de méthadone, d'où la sensation de manque. Il faut avant tout veiller à ne pas susciter la reprise de la consommation d'héroïne ou une conduite polytoxicomaniaque (alcool, tabac, médicaments psychotropes, cocaïne), préjudiciable au fœtus. L'innocuité de l'administration de buprénorphine pendant la grossesse n'a pas été formellement démontrée, et l'on préfère dans cette situation utiliser la méthadone.

La thérapeutique de substitution repose actuellement, en France, sur l'administration de deux médicaments morphiniques de longue durée d'action, peu euphorisants : la méthadone (agréée en France depuis 1995 dans le traitement des pharmacodépendances aux opiacés) ou la buprénorphine (également agréée depuis 1995 et disponible en officine depuis 1996). L'utilisation de ces médicaments est encadrée par la Commission consultative des traitements de substitution créée par l'arrêté du 7 mars 1994.

1. Méthadone

Dès 1946, on montra aux États-Unis que la méthadone, un analgésique central synthétisé par les Allemands pendant la guerre, permettait de traiter efficacement les manifestations de manque en morphine. Jusqu'au début des années 1960, elle ne fut utilisée que pour faciliter le sevrage en opiacés, sous forme de cures brèves, à doses dégressives. En 1962, dans un contexte où la mortalité liée à l'héroïnomanie constituait la première cause de mortalité chez les New-Yorkais de 15 à 35 ans, trois médecins américains (Vincent P. Dole, Marie Nyswander, Mary Jeanne Kreek) montrèrent qu'une posologie quotidienne de méthadone comprise entre 80 et 120 mg permettait aux patients héroïnomanes de mener une existence socialement acceptable et bloquait les effets des drogues opiacées qu'ils étaient capables de s'injecter.

La méthadone est un agoniste opiacé, comme la morphine ou l'héroïne, et en possède donc toutes les propriétés pharmacologiques. Elle exerce un effet sédatif, analgésique et antitussif par action sur le cerveau, elle atténue les réflexes émétiques (mais, comme les autres opiacés, elle est initialement émétisante chez les sujets non accoutumés) et elle induit un ralentissement du rythme respiratoire sujet à une rapide tolérance. En cas de surdosage, elle provoque une dépression respiratoire. Elle entraîne des modifications hormonales, au niveau de l'hypophyse notamment, avec retentissement inconstant sur la libido et dysménorrhée. Enfin, elle est à l'origine de constipation, de sécheresse buccale, de dysurie, d'une hypersudation, d'une baisse de la pression artérielle (risque de vertiges), et, parfois, de sensations prurigineuses (libération d'histamine).

La méthadone peut donner lieu à un usage addictif analogue à celui décrit avec la morphine ou l'héroïne : elle est, au même titre, inscrite sur la liste des stupéfiants. L'arrêt d'un traitement prolongé se traduit par des signes de sevrage identiques à ceux décrits avec l'héroïne mais plus retardés dans le temps (l'élimination de la

méthadone de l'organisme est bien plus lente que celle de la morphine : sa demi-vie varie, lors d'un traitement chronique, entre 20 et 30 heures).

Le traitement type par méthadone s'articule en quatre étapes :

- une phase d'évaluation préalable de la situation spécifique du patient : degré de pharmacodépendance (modalités d'usage des produits, variétés des produits utilisés), trajectoire du patient (antécédents, cures et échecs successifs, entourage affectif et familial, liens sociaux, antécédents d'overdoses) et motivation à suivre le traitement ;
- une phase dite d'induction, visant à équilibrer la posologie quotidienne afin que le patient ne ressente aucun effet de manque ;
- une période de stabilisation plus ou moins prolongée (souvent plusieurs années) permettant une réadaptation psychosociale et un suivi médical ;
- une phase de sevrage progressif, étalée sur trois ou quatre semaines, avec éventuel relais de transition de la méthadone vers la buprénorphine, ou suspension progressive mais directe de l'administration de méthadone.

La prescription de la méthadone est plutôt destinée aux toxicomanes les plus marginalisés, les plus dépendants ou présentant des troubles psychopathologiques majeurs. Ce traitement ne peut être démarré que dans un centre conventionné ; le relais peut être pris lorsque le patient est stabilisé – et bénéficie d'un minimum d'insertion sociale – par un généraliste impliqué dans un réseau, le médicament étant alors délivré en officine pour 7 jours au maximum.

L'analyse urinaire constitue un élément objectif permettant de valider l'abstinence du sujet. Le patient peut devancer le résultat de l'analyse en évoquant de façon spontanée la prise de drogues : ceci ouvre à une relation plus authentique.

Les effets indésirables le plus souvent rapportés lors du traitement sont une constipation et une sécheresse buccale (70 % des cas), des démangeaisons de la peau ou du nez, une irrégularité des règles (50 % des cas). Une sudation excessive est également fréquente (85 % des cas), ainsi qu'une léthargie avec baisse de la libido, des difficultés à se concentrer, des vertiges, une rétention urinaire, de rares vomissements. Ces signes disparaissent avec le prolongement du traitement.

2. Buprénorphine

La buprénorphine est à la fois un antagoniste et un agoniste partiel des récepteurs aux opiacés (respectivement les récepteurs κ et μ). Cette molécule analgésique (Temgésic® sous forme de comprimés à 0,2 mg, disponible en France depuis 1987) bénéficie depuis 1995 d'une autorisation de mise sur le marché en France dans le cadre du traitement de la dépendance à l'héroïne (Subutex® sous forme de comprimés dosés à 0,4 mg, 2 mg et 8 mg). Elle est moins toxique que la méthadone en cas d'usage abusif et sans contexte de polyintoxication (pas de risque de dépression respiratoire grave et moins de sensation d'euphorie si elle est utilisée isolément par voie sublinguale conformément à son AMM). Sa durée d'action est de 30 heures environ. Les doses utilisées dans cette indication sont supérieures à celles requises dans le traitement de la douleur : 4 à 8 voire 16 mg/j par voie sublinguale.

La buprénorphine neutralise partiellement les effets de l'héroïne, calme le syndrome de manque et n'expose pas à un risque de tolérance. Il faut toutefois l'utili-

ser avec précaution chez l'insuffisant respiratoire, hépatique ou rénal ainsi que chez la femme enceinte ou allaitante. Elle expose à des risques de constipation, de maux de tête, de troubles du sommeil, de nausées et vomissements, de sueurs profuses.
Le détournement de ce médicament demeure d'une grande fréquence. Certains toxicomanes cumulent les prescriptions puis inhalent les comprimés pulvérisés ou s'injectent un filtrat de comprimés. Mais les cas de décès par dépression respiratoire observés chez des utilisateurs de buprénorphine surviennent essentiellement dans le contexte d'un détournement du médicament, par voie intraveineuse et en association avec des benzodiazépines et/ou de l'alcool.
La prescription de buprénorphine s'adresse avant tout à des patients suivis en médecine libérale. Le médicament peut être en effet directement prescrit par tout médecin dans le cadre d'une thérapeutique globale et d'un travail en réseau. Son administration expose à un risque de sevrage si le toxicomane a utilisé des opiacés juste avant la buprénorphine (en raison de ses propriétés antagonistes partielles). Mais, surtout, il est avéré que l'association de buprénorphine (détournement des comprimés qui sont écrasés puis injectés par 10 à 50 % des patients) à d'autres psychotropes potentiellement dépresseurs de la respiration (benzodiazépines) et probablement à l'alcool induit un risque important de dépression respiratoire parfois fatale.
Contrairement à la méthadone, la buprénorphine n'a pas le statut de stupéfiant. Sa délivrance n'en fait pas moins l'objet d'une surveillance renforcée (prescription sur un carnet à souches pour 7 jours au maximum, sauf demande expresse du médecin qui peut la porter à 28 jours).

E. Antagonistes opiacés

Les antagonistes opiacés sont avant tout utilisés dans l'urgence toxicologique, car leur administration permet de lever la dépression respiratoire induite par l'héroïne, la morphine ou la méthadone.

1. Naloxone (Nalone®, Narcan®)

La naloxone est un antagoniste opiacé utilisé en thérapeutique dans le traitement de l'intoxication aiguë aux opiacés. Elle exerce aux doses usuelles une activité purement antagoniste sur les récepteurs aux opiacés, mais, à des doses plus conséquentes, elle peut donner lieu à des effets agonistes ou mixtes. Elle est administrée pour lever la dépression respiratoire induite par les opiacés, notamment en cas d'overdose chez le toxicomane. Une première dose de 0,4 à 2 mg est administrée en ce cas par voie intraveineuse et répétée toutes les 2 à 3 minutes. Si aucune réponse clinique n'est notée après administration d'une dose totale de 10 mg de produit, il faut envisager une autre étiologie à la dépression respiratoire. L'activité de la naloxone survient en 2 minutes environ et persiste 1 à 4 heures.
L'administration de la naloxone est bien tolérée. On rapporte essentiellement des cas isolés de nausées et vomissements, parfois des troubles tensionnels, de l'arythmie cardiaque, des convulsions.
La naloxone permet également d'établir un diagnostic de dépendance aux opiacés, soit par voie intraveineuse – elle déclenche alors un syndrome de sevrage –, soit

par voie conjonctivale, par application locale d'une solution à 1 % – elle induit une mydriase chez les sujets dépendants –, cette dernière méthode donnant lieu à controverse quant à ses résultats.

2. Nalorphine

Les propriétés de la nalorphine sont proches de celles de la naloxone. La nalorphine antagonise la dépression respiratoire induite par l'intoxication aiguë aux opiacés (héroïne notamment), mais peut exacerber une dépression respiratoire induite par l'alcool, des dépresseurs non opiacés, voire de faibles doses de morphine ou d'agonistes opiacés (à cause de l'effet agoniste partiel, expliquant l'abandon de ce produit). Dans le traitement de l'overdose, la nalorphine est administrée par voie intraveineuse à la dose de 5 à 10 mg répétée toutes les 5 à 15 minutes jusqu'à reprise de la respiration sans excéder toutefois une dose totale de 40 mg. Cette séquence peut être réitérée par la suite en cas de nouvelle dépression respiratoire.

3. Naltrexone (Nalorex®, Révia®)

Cet opiacé a une action similaire à celle de la naloxone, mais il est plus puissant et agit plus longuement. Le traitement ne doit jamais être entrepris avant que le sujet ne soit totalement sevré et devenu abstinent à l'égard des opiacés pendant au moins une à deux semaines. Cette abstinence sera vérifiée par une analyse d'urine et, au besoin, par administration de naloxone dans une perspective diagnostique. La naltrexone s'administre par voie orale à la dose de maintenance de 50 mg par jour, ou de 100 mg tous les deux jours, voire de 150 mg tous les trois jours. L'utilisation thérapeutique de la naltrexone est délicate car ce produit, s'il antagonise les effets euphorisants de l'héroïne ou d'autres drogues similaires, ne supprime pas l'envie de s'injecter de la drogue. Elle est donc indiquée chez des toxicomanes motivés dans leur volonté de « décrocher » de la drogue, bénéficiant d'un encadrement socioculturel suffisamment étayant et ayant un profil psychologique leur permettant de supporter la frustration de la privation d'opiacés. L'administration de naltrexone peut précipiter un syndrome de sevrage chez le sujet dépendant des opiacés. Il survient dans les minutes qui suivent l'ingestion du produit et peut se prolonger jusqu'à deux jours. La naltrexone bénéficie également d'une indication dans la réduction et le contrôle de l'appétence pour l'alcool chez l'alcoolique sevré.

V. Cocaïne et crack

A. Drogue et son usage

C'est en 1859 qu'un étudiant en chimie, Albert Niemann (1834-1861), isola des feuilles du cocaïer, un arbuste originaire des Andes, une substance qu'il dénomma cocaïne dont la structure fut élucidée en 1865. L'avancement des travaux en chimie permit dès cette époque d'extraire en quantité l'alcaloïde, ce qui autorisa de

nombreuses applications thérapeutiques liées notamment à son action anesthésique locale.

1. Cocaïne sous forme de sels (chlorhydrate, sulfate)

L'ingestion de la cocaïne constitua un mode de consommation courant au XIX[e] siècle qui fut longtemps pérennisé en médecine (extrait, teinture, vin à base de coca). La cocaïne est aisément résorbée au niveau des muqueuses et notamment de la muqueuse nasale : les consommateurs peuvent priser la drogue. La ligne, ou le rail, de coke sont « sniffés » à l'aide d'une paille. L'action est obtenue en deux à trois minutes. La voie nasale est demeurée ainsi longtemps la modalité la plus populaire d'utilisation hédoniste de la drogue.
L'administration intraveineuse de la drogue, seule ou associée à de l'héroïne, de la phencyclidine ou des barbituriques, induit un effet presque immédiat (en environ une ou deux minutes). Elle est commune chez les polytoxicomanes. L'utilisation par voie intramusculaire ou sous-cutanée est rare.
La cocaïne est souvent frelatée, et le titre de la poudre achetée sur le marché de détail est faible (3 à 35 % environ). La drogue est « coupée » par diverses substances dont des anesthésiques locaux (lidocaïne, tétracaïne, procaïne) qui miment son action lorsque l'acheteur la goûte, des sucres, du bicarbonate de soude, du paracétamol, de l'aspirine (censés prévenir les céphalées), de la vitamine C ou de la caféine (censées prévenir l'abattement qui suit la consommation de la drogue), de l'amidon, du talc, du plâtre, parfois même du ciment, voire de la strychnine, etc. Elle est également mélangée à d'autres stupéfiants, excitants comme les amphétamines, dépresseurs comme l'héroïne, ou associée à divers médicaments psychotropes.

2. « Pasta »

La pâte de coca ou *pasta* est un intermédiaire obtenu lors de l'extraction de la cocaïne des feuilles de coca. Fumée en mélange à du tabac (*bazuco, basuco*) ou du cannabis, elle induit des effets psychostimulants analogues à ceux décrits avec la cocaïne.

3. Cocaïne sous forme basique ou crack

Le crack n'est rien d'autre qu'une forme spécifique de la cocaïne (onomatopée évoquant le bruit que produisent les cristaux en se consumant) destinée à être fumée ou, plus exceptionnellement, injectée (synonyme : *free-base*). Effectivement, la cocaïne sous forme de base se volatilise à température bien moindre que sous forme salifiée. Cette propriété explique que ses vapeurs puissent être inhalées dans des pipes (c'est le *free-basing*) ou que la drogue puisse être fumée en mélange à du tabac et/ou du cannabis, dans des cigarettes par exemple.
Les vapeurs gagnent les alvéolaires pulmonaires où l'alcaloïde passe dans le sang. L'action survient en cinq à dix secondes, de façon plus rapide que lors d'une injection intraveineuse (puisque le sang artériel quitte les poumons pour transiter par le cœur puis l'aorte et gagner directement le cerveau : le circuit veineux est ainsi court-circuité) mais cette action est aussi bien plus brève.

Les usagers de crack recherchent une sensation fulgurante, proche du flash induit par l'injection de drogue, mais dont les effets fugaces les poussent à recommencer rapidement et de façon compulsive l'administration. Les conséquences cliniques de l'utilisation du crack sont celles, exacerbées, de l'usage de la cocaïne sous forme salifiée. L'utilisation de cette forme de cocaïne induit une dépendance rapide, plus forte que lorsque l'alcaloïde est simplement « sniffé ».

B. Pharmacologie

La cocaïne bloque la recapture d'un certain nombre de neuromédiateurs, en particulier de la dopamine et, dans une moindre mesure, de la noradrénaline et de la sérotonine. Ainsi, la cocaïne entraîne une activation importante des neurones dopaminergiques (dont le rôle privilégié dans les effets hédoniques des drogues est clairement établi) dans diverses régions du cerveau, en particulier dans le *nucleus accumbens*, structure jouant un rôle clé dans la régulation des états émotifs.

C. Clinique

Les effets cliniques de la consommation de cocaïne résultent pour l'essentiel d'une intense stimulation du système nerveux sympathique. Ils sont variables selon le mode de consommation. Les effets cardiaques, neurologiques, respiratoires et psychiques les plus puissants suivent l'usage de crack ou de cocaïne par voie injectable. Le traitement de ces manifestations reste purement symptomatique.

1. Toxicité cardiovasculaire

Par son action stimulante sur le système nerveux central et le tonus sympathique périphérique, la cocaïne détermine une vasoconstriction intense. Des rhabdomyolyses aiguës par vasoconstriction des artérioles musculaires sont décrites, ainsi que des nécroses de tissus insuffisamment irrigués (ischémie des doigts, orteils, intestins, moelle épinière, etc.) – l'exemple type est la cloison nasale, finissant par se nécroser lorsque la drogue est prisée.
La consommation de cocaïne induit une accélération du rythme et de la contractilité du cœur ainsi que des troubles du rythme comme tous les anesthésiques locaux. Les besoins en oxygène du muscle cardiaque, alors fortement sollicité, augmentent donc. La vasoconstriction et l'effet direct sur le cœur induisent des crises hypertensives parfois paroxystiques, à l'origine possible d'autres troubles (hémorragies pulmonaires et cérébrales, dissection aortique), ainsi que de l'angor et des infarctus myocardiques, même chez des sujets très jeunes.

2. Toxicité sur le système nerveux

Les céphalées, fréquentes chez l'usager de cocaïne, peuvent constituer le premier signe d'une hémorragie méningée. Les convulsions sont fréquentes car la cocaïne, comme les autres anesthésiques locaux, abaisse le seuil épileptogène. Elles traduisent non seulement une atteinte vasculaire au niveau du système nerveux central, mais également des troubles du rythme cardiaque.

L'activité dopaminergique peut se traduire par une hyperthermie analogue au syndrome malin des neuroleptiques et faisant évoquer l'hyperthermie décrite au décours de la consommation d'ecstasy.

3. Toxicité pulmonaire

Beaucoup de consommateurs se plaignent de signes fonctionnels respiratoires (toux, expectorations sanglantes, douleurs thoraciques parfois vives, dyspnée). Les complications pulmonaires (pneumomédiastin, pneumopéricarde, réduction de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone et hémorragie alvéolaire) sont essentiellement corrélées à l'usage de crack. Les hémorragies pulmonaires résultent de la conjonction d'une nécrose des tissus constituant les vaisseaux sanguins et de l'hypertension artérielle. Cette pathologie sous-estimée doit inciter à la prudence face à tout saignement de nez (hémoptysie), même minime, survenant chez un consommateur de cocaïne.
Un œdème aigu du poumon (OAP) ou une pneumopathie d'inhalation (syndrome de Mendelson) peut survenir rapidement après injection ou inhalation. Le décès suit parfois en quelques heures, mais, inversement, une résolution spontanée reste possible.
À plus long terme, la cocaïnomanie peut induire une fibrogranulomatose pulmonaire par dépôt de diluants (talc, amidon, cellulose) dans les capillaires, lors d'un usage parentéral ou lors d'une pratique de prise. Les symptômes associent toux et dyspnée à une éventuelle insuffisance cardiaque. Une hypertension artérielle pulmonaire isolée est aussi fréquente.
Certains signes pulmonaires caractérisent l'usager de crack. Il s'agit de lésions accompagnées d'une dyspnée et de douleurs violentes. Une forte fièvre peut compléter le tableau. Lorsqu'une cause infectieuse est éliminée, ce syndrome du « poumon à crack » peut être soulagé par administration de fortes posologies d'anti-inflammatoires. Une hémorragie pulmonaire peut assombrir rapidement le pronostic vital.

4. Toxicité hépatique

La majeure partie des troubles résulte d'une infection hépatique.

5. Toxicité rénale

Les ischémies par vasoconstriction dominent. Un tableau d'insuffisance rénale aiguë est décrit lors d'une intoxication aiguë.

6. Complications psychiques

Lors d'une consommation occasionnelle à faible dose, l'usager décrit une sensation d'euphorie et de bien-être, d'empathie, d'hypervigilance. Son activité psychique est accrue. Il est sujet à des insomnies. Lorsque les doses sont répétées sur une brève période, la fin de l'activité du produit se traduit par une anxiété inclinant à utiliser à nouveau de la drogue.

Lorsque la dose utilisée est plus importante, le consommateur peut être la proie d'une agitation psychomotrice intense, accompagnée d'idées délirantes et d'un vécu paranoïaque (sentiment de persécution, illusions sensorielles, amnésie). Des comportements violents sont rapportés, notamment après injection de la drogue ou inhalation de crack.

En cas d'usage régulier, le consommateur devient sujet à une grande instabilité caractérielle (dysphorie). Les illusions sensorielles se généralisent. Les délires d'interprétation revêtent volontiers une forme paranoïde. Il faut rapporter aussi de fréquentes attaques de panique. Les phases de dépression alternent alors avec les phases d'excitation maniaque, d'insomnie, d'amnésie.

D. Intoxication aiguë par la cocaïne ou le crack

Les conséquences somatiques de la consommation massive de cocaïne dépendent de la sensibilité individuelle : dilatation pupillaire (mydriase), accélération du rythme cardiaque (tachycardie), hypertension, hypersudation, hyperthermie, stase urinaire et fécale, spasmes musculaires et rashs cutanés. Des mouvements stéréotypés de la bouche et de la langue ainsi que des convulsions sont souvent décrits. Sur le plan psychique, l'intoxication est dominée par le délire.

Le décès survient par arrêt cardiaque après une crise d'arythmie ou par arrêt respiratoire. L'augmentation de la pression artérielle (vasoconstriction) peut induire un infarctus cérébral et des hémorragies méningées. Il est décrit après consommation de doses variables : 700-800 mg par voie intraveineuse ou sous forme de crack. Des sujets particulièrement vulnérables sont décédés après la consommation de 20 à 40 mg de cocaïne.

Le traitement, symptomatique, vise à traiter l'hyperthermie, l'hypertension, les troubles du rythme, la vasoconstriction des coronaires, mais aussi à traiter les manifestations psychiques par administration d'anxiolytiques et/ou de neuroleptiques.

E. Tolérance et dépendance

1. Tolérance

Le développement d'une tolérance à la cocaïne concerne seulement certains des effets de la drogue, notamment l'euphorie et la sensation de bien-être faisant suite aux premières administrations, mais également l'anorexie et la libido. Elle est liée à la susceptibilité individuelle. D'autres effets, notamment cardiaques, peuvent augmenter lorsque l'organisme est soumis de façon réitérée à l'action de la drogue. Ils peuvent persister même après sevrage. Ce phénomène (sensibilisation ou sursensitivité) correspond à une réaction des récepteurs en réponse à la déplétion en neuromédiateur induite par l'épuisement des réserves neuronales.

2. Dépendance

Beaucoup de consommateurs de cocaïne perdent rapidement, comme les usagers d'amphétamines, la possibilité de contrôler l'usage de la drogue. La cocaïne est

l'une des drogues occasionnant le renforcement positif le plus important chez l'animal et donc l'une des drogues les plus addictives.
Le syndrome de sevrage faisant suite à l'arrêt brutal d'une consommation chronicisée de cocaïne se traduit par une anhédonie, une diminution des activités, une perte des motivations et, globalement, des manifestations dépressives.

VI. Amphétamines

L'amphétamine est le chef de file d'une famille de substances chimiquement et pharmacologiquement proches les unes des autres, désignées d'une façon générique comme « amphétamines » ou, populairement, *speed* (« vitesse » en anglais). Les effets de ces drogues sont voisins de ceux induits par l'usage de cocaïne. Héritières de l'éphédrine, un alcaloïde végétal connu comme puissamment stimulant, elles furent étudiées par les pharmacologues des années 1930 à 1950. Leur administration massive aux soldats pendant la Seconde Guerre mondiale permit de valider leurs effets stimulants.
La métamphétamine, facilement synthétisable dans des laboratoires clandestins, est commercialisée sous la dénomination d'*ice* ou *glass* (respectivement « glace » et « verre » en américain, par référence à l'aspect blanc transparent de ses cristaux) pour la forme basique, aisément vaporisable, et de *crank* ou de *crystal* pour la forme salifiée, très hydrosoluble. Il s'agit d'une drogue utilisée sous forme prisée ou injectée (forme salifiée) – l'injection est alors douloureuse pour la muqueuse nasale ou les veines – mais aussi par inhalation, exactement comme le crack (forme basique) dans une pipe ou dans une cigarette. L'association de cocaïne et d'amphétamine est d'ailleurs répandue.
Il est fréquent que soit vendues sur le marché clandestin comme amphétamines des molécules sympathomimétiques moins puissantes : éphédrine, décongestionnants nasaux divers (phénylpropanolamine, etc.), voire comprimés de caféine.
De nombreuses amphétamines ont été commercialisées comme médicaments stimulants jusque dans les années 1970, et certaines spécialités sont demeurées célèbres : Ortédrine®, Maxiton®, Benzédrine®. Des dérivés non moins nombreux ont été commercialisés comme anorexigènes : leur usage ayant souvent donné lieu à des abus est désormais strictement contrôlé.

A. Pharmacologie cellulaire

Les amphétamines sont des agonistes sympathomimétiques. Elles exercent leur activité directement sur les neurones noradrénergiques et dopaminergiques ; toutefois, certaines d'entre elles (l'ecstasy – *cf. infra* – et autres phényléthylamines) ont une action préférentielle et presque spécifique sur les neurones à sérotonine.
Dans tous les cas, les amphétamines agissent sur la libération des neuromédiateurs : elles les déplacent de leurs sites de stockage (les vésicules contenues au sein du cytoplasme) et augmentent massivement leur libération dans la synapse grâce au fonctionnement inversé du transporteur localisé sur la membrane du neurone

– les amphétamines « vidangent » littéralement les cellules de leur contenu en neuromédiateur. Ces stimulants de l'éveil ont donc en commun la propriété d'épuiser les neurones, expliquant que les effets psychostimulants et anorexigènes soient temporaires, et ne perdurent que pendant le temps où l'activité de certains réseaux de neurones du cerveau est amplifiée par le recrutement (sous l'effet de la drogue) de toute la quantité de neurotransmetteur disponible dans la cellule.

B. Clinique

Les effets de l'administration d'amphétamines persistent en général 3 à 6 heures : ils sont donc sensiblement plus prolongés que pour la cocaïne, pour laquelle ils persistent 30 minutes à 1 heure.

1. Effets sur le psychisme

Les amphétamines réduisent le sommeil ou, souvent, l'empêchent totalement. Elles augmentent de façon temporaire la vigilance et limitent la sensation de fatigue. Ces effets euphorisants et stimulants expliquent leur consommation par des sportifs, mais aussi par des étudiants ou dans tous les milieux exigeants en performance. Ces manifestations, temporaires, sont suivies d'une phase d'abattement, avec irritabilité, dépression, lassitude et souvent agressivité.
Les sujets recourant avec régularité aux amphétamines font montre d'une activité maniaque, d'altérations du jugement, d'une augmentation de l'agressivité parfois accompagnée de passages à l'acte, d'un amaigrissement (action anorexigène) et d'insomnie (expliquant le recours simultané à des hypnotiques tels les barbituriques ou à des opiacés). Le traitement de ces signes est avant tout symptomatologique.

2. Effets sur les fonctions physiologiques

Les amphétamines accélèrent le rythme cardiaque, d'où hypertension artérielle avec risque d'hémorragies (cerveau, poumon) et d'arythmie. Leur action vasoconstrictrice aggrave l'hypertension. Elles accélèrent aussi le rythme respiratoire mais dilatent les bronches. La tolérance au produit tend toutefois à limiter l'incidence de ces effets physiques.
La toxicité des amphétamines ainsi que la forte dépendance psychique qu'elles sont susceptibles d'entraîner expliquent que les molécules les plus puissantes soient inscrites en France sur la liste des stupéfiants depuis l'arrêté du 2 octobre 1967 (les exonérations dont elles bénéficiaient en France, leur permettant d'être vendues sans ordonnance, avaient été supprimées en 1955).

C. Intoxication aiguë

L'intoxication aiguë amphétaminique évoque l'intoxication par la cocaïne : les signes sympathomimétiques dominent. La toxicité est variable selon la réponse individuelle, et des cas mortels ont été signalés au décours de l'ingestion de quantités réduites de produit. L'intoxication se traduit par une hyperactivité désordon-

née, avec état confusionnel, angoisse et parfois illusions sensorielles (hallucinations). Les signes somatiques sont nombreux : hypertension artérielle, tachycardie, tachypnée, hyperthermie, sueurs, mydriase bilatérale, hypertonie généralisée, trismus, douleurs abdominales, nausées et vomissements. Des manifestations psychiques se surajoutent au tableau : état délirant aigu, maniaque, paranoïde, avec agressivité (violence, suicide). Le décès peut survenir par trouble du rythme cardiaque, tachycardie ou spasme des coronaires (infarctus). Les accidents artériels (hémorragie cérébrale ou pulmonaire) sont relativement fréquents. On a décrit épisodiquement des rhabdomyolyses, une anurie par nécrose des tubules rénaux.
Cette intoxication impose un lavage gastrique ou l'ingestion de fortes quantités de charbon actif, qui fixe le toxique et l'empêche de gagner le sang. Lorsque la fonction rénale est préservée, il est possible d'acidifier l'urine pour accélérer l'élimination de la drogue. Le traitement est, par ailleurs, symptomatique : administration de tranquillisants ou d'antipsychotiques, hydratation, contrôle de l'hyperthermie, administration d'anticonvulsivants et d'hypotenseurs en cas de besoin.

VII. Ecstasy (MDMA)

L'ecstasy (méthylène-dioxy-3,4-méthamphétamine, abrégée en MDMA ; synonymes : ecsta, pilule d'amour, essence, E, EX, XTC, Adam, MDM ou encore *chamallow*, etc.) est une phényléthylamine dont l'usage comme psychostimulant et agent « empathogène » ne cesse de se développer.
L'ecstasy est vendue sous forme de comprimés ou de gélules contenant de quelques milligrammes à plus de 200 mg de MDMA. D'autres produits apparentés à la MDMA sont parfois vendus sous la dénomination d'ecstasy (MDA, MDEA, MBDB, 2-CB, etc.), parfois isolément, parfois en mélange. Il est fréquent de retrouver, lors de l'analyse chimique des comprimés, diverses substances également toxiques : stimulants (amphétamines, caféine ou éphédrine), analgésiques (codéine, aspirine, paracétamol), hallucinogènes (LSD, atropine, kétamine, phencyclidine), anabolisants divers (testostérone, etc.).

A. Pharmacologie

L'ecstasy (MDMA) agit essentiellement sur les neurones sérotoninergiques, neuromédiateur impliqué notamment dans la régulation des affects et de l'humeur ainsi que dans le contrôle de l'impulsivité. Elle entraîne une libération massive de la sérotonine, une inhibition de sa synthèse et un blocage de sa recapture par le neurone émetteur.
Cette action est associée à ses effets psychotropes. Cette première phase est suivie d'une déplétion corticale en sérotonine (« vidange des neurones »), maximale entre la 6ᵉ et la 18ᵉ heure puis normalisée en 24 heures. Les états dépressifs qui suivent la prise de MDMA pourraient être associés à cette diminution de la concentration en sérotonine au niveau cérébral. De même, l'hyperthermie, constituant l'une des conséquences péjoratives les plus graves de l'usage de MDMA, évoque le syndrome

d'hypersérotoninergie décrit au décours de l'usage de certains médicaments actifs sur la synapse sérotoninergique (antidépresseurs du groupe des IRS notamment).
Une baisse de la concentration en sérotonine, qui peut se poursuivre plusieurs semaines, commence environ 24 heures après la prise. Cette phase à long terme, étudiée chez les rongeurs et les primates, est associée à une diminution de la fonction sérotoninergique par dégénérescence des neurones et à une chute rapide de l'activité d'un enzyme catalysant la synthèse de la sérotonine dans les neurones, la tryptophane-hydroxylase. L'inhibition enzymatique étant irréversible, l'activité n'est restaurée que deux semaines plus tard par la synthèse de nouvelles enzymes. Cette altération serait provoquée par un des métabolites de la MDMA qui oxyderait l'enzyme. Cette baisse d'activité enzymatique expliquerait en partie la diminution de la synthèse de sérotonine observée après la prise de MDMA et les différents effets psychiatriques qui en découlent.
Chez le rat soumis à l'administration chronique de MDMA, l'analyse histologique met en évidence une destruction sélective des terminaisons sérotoninergiques, à des doses toutefois plus élevées que celles induisant des effets psychotropes dans l'espèce humaine. Il ne semble pas que les réseaux dopaminergiques ou noradrénergiques soient concernés. Cet effet est également retrouvé chez les primates, mais à des doses bien moindres. L'amplitude et la dégénérescence sont dans ce cas nettement plus marquées. Les lésions sérotoninergiques induites par la drogue diffèrent selon les zones du cerveau. Le cortex frontal est particulièrement touché. Une possibilité de repousse des neurones détruits est décrite chez le rat, mais la réinnervation est en ce cas anarchique. Il en est de même chez les primates : l'atteinte semble en partie irréversible.
La MDMA perturbe également la transmission médiée par la dopamine et la noradrénaline. Son effet sur ces deux neuromédiateurs reste toutefois quantitativement faible. De plus, la libération de la sérotonine sous l'effet de la MDMA induit une augmentation de la libération de dopamine par interactions entre les neurones sérotoninergiques et les neurones dopaminergiques. Cette action dopaminergique pourrait expliquer la survenue possible de signes similaires à ceux des psychoses amphétaminiques.
La MDMA a par ailleurs une affinité pour les récepteurs adrénergiques de type $\alpha 2$ qui pourrait expliquer les effets cardiovasculaires de la drogue. Elle perturbe, d'une façon analogue à celle décrite pour les amphétamines végétatives, les régulations sur le cœur et les résistances vasculaires.

B. Clinique

1. Effets sur le psychisme

L'action de la MDMA est double : essentiellement psychostimulante et légèrement psychodysleptique. L'usage de l'ecstasy permet une levée des inhibitions sociales avec une augmentation de la sensualité et des besoins de contacts tant intellectuels que physiques, associée à une diminution de l'anxiété et du caractère défensif : il s'agit d'une drogue parfois qualifiée d'« empathogène ».
La MDMA est généralement consommée à des doses de 50 à 200 mg. Des doses supérieures peuvent entraîner des troubles sensoriels proches de ceux décrits avec

le LSD. Les effets sont liés à la vulnérabilité individuelle, au contexte de l'utilisation et, pour quelques-uns (activité cardiovasculaire par exemple) au développement d'une tolérance.

Après une prise de l'ordre de 150 mg de MDMA, beaucoup d'utilisateurs décrivent une période de désorientation durant environ trente minutes, avec parfois des mouvements de crispation spasmodique (notamment des muscles de la mâchoire : c'est le trismus). Suit une période de stimulation euphorique de trois à six heures où la communication avec autrui est subjectivement améliorée, caractérisée par l'abolition de la sensation de fatigue et des troubles de la mémoire. La stimulation psychomotrice et l'insomnie sont recherchées par certains danseurs (raves, rassemblements techno) qui veulent améliorer leurs performances physiques.

Cette phase précède un état d'épuisement et de dépression, durant environ huit heures et qui, parfois mal supporté, peut incliner à utiliser d'autres psychotropes censés en limiter l'expression (cannabis, anxiolytiques, antidépresseurs). Mais les réactions psychiques peuvent être plus alarmantes avec crise aiguë d'angoisse, voire attaque de panique avec même des réactions violentes. La phase dépressive peut, elle aussi, être plus grave et perdurer plusieurs semaines chez des individus plus sensibles au produit ou psychiquement fragilisés. Des flash-back sont décrits au décours d'une utilisation, même ponctuelle, d'ecstasy.

Comme pour le cannabis, des perturbations psychopathologiques durables ont été décrites chez des usagers d'ecstasy (ou de drogues présentées comme telles). Les troubles d'allure psychotique répondent favorablement au traitement par antipsychotiques. Dans de rares cas, l'évolution se fait sur un mode chronique, voyant alterner des phases d'exacerbation – engendrées par la prise d'ecstasy ou de cannabis – et de rémission.

2. Effets sur les fonctions physiologiques

Le traitement des manifestations physiques de l'intoxication est purement symptomatique, car il n'existe pas d'antidote à l'intoxication par l'ecstasy.

a) Hyperthermie

Constituant le risque toxique majeur induit par la prise d'ecstasy, elle est exacerbée par les conditions de l'environnement. La foule, la température élevée, l'activité physique intense et prolongée, la déshydratation ou la consommation de boissons enrichies en acides aminés (*smart-drinks*) font des raves un contexte potentialisateur de la toxicité de l'ecstasy.

Cette hyperthermie est associée à une rhabdomyolyse, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et à des défaillances viscérales multiples. Elle survient après un épisode d'agitation, de sudation profuse, de variations tensionnelles et d'accélération du rythme cardiaque, 4 à 5 heures après la prise du produit. La température atteint rapidement 42 °C. Si elle dépasse ce seuil, le pronostic vital est réservé. Le sujet perd généralement connaissance, peut être pris de convulsions, avec trismus et mydriase réactive. Il s'agit d'une urgence thérapeutique majeure, impliquant l'injection de dantrolène, une réanimation et des mesures symptomatiques visant à refroidir l'organisme. Si les formes mineures peuvent régresser en quelques jours sans traitement, les formes fulminantes peuvent entraîner un décès

rapide. La survenue de cette hyperthermie n'est pas liée à la dose ; elle peut survenir même après de nombreuses prises de MDMA bien tolérées. Probablement est-elle la conséquence d'une vulnérabilité individuelle d'origine génétique démasquée par un paramètre de l'environnement ou du contexte de l'utilisation.

b) Hypertension et arythmie cardiaque

Elles sont associées à des troubles de la coagulation et peuvent être à l'origine d'hémorragies cérébrales.

c) Hépatites

Elles surviennent au décours d'un syndrome hyperthermique, dans un contexte de troubles affectant plusieurs viscères. Des cas sporadiques d'hépatites isolées, survenant plusieurs jours après la consommation de la drogue, ont été publiés. L'atteinte débute de façon insidieuse par un ictère avec cytolyse. L'évolution se fait vers une insuffisance hépatocellulaire avec encéphalopathie. Des décès ont été rapportés. Un usage chronique d'ecstasy peut induire une stéatose et une cirrhose. Le mécanisme de la toxicité hépatique de la MDMA – et des produits analogues – reste inconnu. Il est peut-être lié à un déficit enzymatique d'origine congénitale.

d) Troubles cardiovasculaires

Tachycardie et troubles du rythme sont fréquents, comme pour toutes les amphétamines.

e) Néphrites

Les troubles rénaux sont occasionnés par une déshydratation mais aussi par les substances associées à la MDMA.

f) Troubles neurologiques

Les accidents aigus, rares, ne sont pas imputés de façon formelle à la MDMA faute d'analyse toxicologique probante. Néanmoins, son implication dans des accidents ischémiques cérébraux ne semble plus faire de doute.

C. Intoxication aiguë

Il n'existe pas d'antidote spécifique à l'intoxication aiguë. Le traitement, symptomatique, vise à diminuer la température corporelle : des locaux climatisés (*chill-out rooms*) sont parfois disponibles lors des raves, ce qui rassure abusivement les utilisateurs.

VIII. LSD

Le LSD (*Lysergik Saüre Diethylamide*) ou, simplement, « acide » est un hallucinogène extrêmement puissant obtenu par synthèse chimique.

Sur le plan structural, le LSD est une substance complexe, à noyau hétérocyclique, non saturé, de type indole, comme la majorité des hallucinogènes. On l'utilise généralement sous forme de sel hydrosoluble. Liquide ou cristallisé, il se présente sous des formes variées : il peut s'agir de comprimés, de petits blocs de gélatine (*windowpane*), de morceaux de buvards imprégnés d'une goutte de produit, ou d'une poudre blanche.

A. Classification

Les hallucinogènes (du latin *hallucinare*, « se tromper, divaguer ») sont des substances psychoactives capables d'induire des hallucinations visuelles, auditives ou, rarement, tactiles. La plupart des hallucinogènes utilisés sont des végétaux ou des alcaloïdes extraits de ceux-ci ; il s'agit plus rarement des produits obtenus par synthèse chimique. On distingue :

- les phényléthylamines : ce groupe comprend, outre la mescaline (alcaloïde extrait d'un petit cactus, le peyotl) et le STP, divers dérivés amphétaminiques proches de l'ecstasy (*cf. supra*) ;
- les dérivés indoliques : ce groupe comprend les nombreux dérivés de la tryptamine : diméthyltryptamine ou DMT, diéthyltryptamine et dipropyltryptamine, la psilocine et son ester phosphorique, la psilocybine, ainsi que la bufoténine (principes psychoactifs contenus notamment dans les champignons hallucinogènes). Il comprend aussi les amides de l'acide lysergique (produit par l'ergot du seigle), dont la diéthylamide connue comme LSD.

L'action des hallucinogènes sur le cerveau fait intervenir de nombreux types de neuromédiateurs dont l'acétylcholine, la dopamine, la noradrénaline mais surtout la sérotonine (beaucoup d'hallucinogènes ont d'ailleurs une structure chimique qui évoque celle de ce neuromédiateur ; d'une façon schématique, les hallucinogènes puissants agissent comme des agonistes des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT2, un groupe de récepteurs abondant dans le cortex).

B. Pharmacologie

Le LSD est l'un des psychotropes les plus puissants connus, puisque 25 µg (25 millionièmes de gramme !) se révèlent déjà agir sur l'homme – les doses utilisées varient entre 100 et 300 µg, parfois plus chez des sujets peu réceptifs (jusqu'à 2 000 µg). Le LSD est surtout administré par ingestion. Seule une faible fraction de la dose administrée parvient au cerveau, ce qui souligne l'extrême activité de la molécule. Il se fixe dans les tissus et disparaît du sang en quelques minutes. Le LSD est oxydé dans le foie en 2-oxy-LSD inactif, éliminé par voie biliaire.

L'effet dominant de l'intoxication lysergique est d'ordre hallucinatoire. L'expérience, ou voyage (*trip*), dure entre six et douze heures. Les premières manifestations surgissent en une demi-heure environ, et une sensation de malaise peu persister plusieurs jours après l'expérience. Le mécanisme exact de l'action du LSD demeure méconnu. Il s'agit d'un antagoniste des récepteurs à la sérotonine, mais cette action ne peut à elle seule expliquer la puissance de ses propriétés hallucinogènes.

C. Manifestations psychiques

Les effets rapportés par les utilisateurs de LSD sont analogues à ceux décrits avec d'autres hallucinogènes : désinhibition, modifications des perceptions avec troubles visuels et auditifs, perturbations somesthésiques, synesthésies (fusion des divers sens : illusion de voir les sons, association entre sonorités et couleurs), modifications subjectives de la notion du temps.

L'expérience au LSD est particulièrement dangereuse pour le psychisme, et les mauvais « voyages » (*bad trips*) sont à l'origine de troubles de l'humeur et de troubles d'allure psychotique.

À fortes doses ou chez des sujets prédisposés, on rapporte des illusions délirantes dangereuses (notamment lorsque l'on imagine pouvoir voler...), des tentatives de suicide ou des perturbations psychiques durables. Il est fréquent que l'utilisateur soit pris d'une crise d'angoisse, de panique, avec la sensation de perdre définitivement la raison, surtout s'il absorbe le produit dans un environnement stressant ou s'il en utilise une dose trop conséquente.

Ces troubles s'estompent en général rapidement (quelques heures à quelques jours), mais peuvent chez des sujets plus vulnérables, ayant notamment des antécédents psychotiques, laisser des séquelles psychiques. L'administration d'anxiolytiques ou de neuroleptiques s'avère souvent indispensable pour calmer les agitations délirantes, en veillant à rassurer le patient et à le maintenir dans une atmosphère calme.

Des phénomènes de flash-back ont été régulièrement décrits avec le LSD (« retours d'acide »), comme avec le cannabis. Ils peuvent également imposer l'administration d'anxiolytiques ou de neuroleptiques.

D. Manifestations neurovégétatives

Les troubles somatiques surviennent précocement après l'ingestion de la drogue. Ils sont limités, eu égard à la faible dose utilisée. Le LSD, comme la plupart des autres dérivés de l'acide lysergique, est néanmoins capable de déclencher de violentes contractions utérines, avec risque d'avortement chez les femmes enceintes. Les signes d'intoxication traduisent l'action sur le système sympathique et sur la médiation sérotoninergique : mydriase avec vision brouillée, transpiration excessive alternant avec une sécheresse buccale, nausées avec parfois vomissements, palpitations cardiaques et accélération du rythme, hypertension, vasodilatation ou, inversement, vasoconstriction, tremblements, incoordination motrice. Certains de ces signes sont probablement expliqués par l'anxiété plus que par l'action pharmacologique du produit.

E. Dépendance et tolérance

L'usage du LSD ne donne pas lieu à dépendance physique ou psychologique, ni à accoutumance.

Tableau 2. Signes principaux d'intoxication aiguë (« overdose ») et de sevrage (« manque ») pour les principales drogues illicites, l'alcool et les solvants organiques

Substances psychoactives	Principaux signes d'intoxication aiguë	Principaux signes de sevrage dans le cadre d'une consommation addictive
Alcool	– Ivresse ordinaire avec excitation psychomotrice et ébriété, puis dépression – Ivresse pathologique, avec hallucinations, délire, convulsion, puis souvent coma (volontiers suivie d'une amnésie) – Coma éthylique avec hypotonie musculaire, dépression respiratoire, hypotension, hypothermie, polyurie, parfois suivie de complications organiques aiguës (pneumopathie, hépatite, pancréatite, etc.) *Les effets sont très variables selon les individus ; les perturbations importantes surviennent en général au-delà d'une alcoolémie de 0,5 à 0,8 g/L.*	– Sensation de malaise général – Tremblement régulier – Nausées et vomissements – Fièvre – Sueur – Hyperréflexie ostéotendineuse – Accélération du rythme cardiaque – Hypertension artérielle – Troubles sensoriels visuels – Convulsions – Insomnie – Confusion mentale – Delirium tremens *La gravité des signes est variable : il existe des formes mineures (survenant par exemple le matin au réveil) ou des formes majeures dont l'extrême est le* delirium tremens.
Cannabis et dérivés	– Conjonctivite – Pression artérielle parfois abaissée – Euphorie exubérante ou anxiété – Sensations de distorsion temporelle – Illusions sensorielles, hallucinations (rares) – Décompensations d'allure psychotique possibles *Les signes psychiques sont liés à la quantité de THC, mais surtout aux conditions d'environnement.*	Manque d'appétit, nausées, insomnies, irritabilité (critères peu spécifiques…) *L'existence d'un syndrome de sevrage psychique est probable. Ces signes s'ajoutent à l'expression de l'anxiété (re)surgissant à l'arrêt de la consommation.*
Opiacés (morphine, héroïne, méthadone, etc.)	– Myosis (rétrécissement pupillaire) – Mydriase si anoxie (bradypnée, voire apnée) – Ralentissement important du rythme respiratoire (< 10 mouvements/min) – Œdème aigu du poumon (OAP) – Pneumopathie d'inhalation – Ralentissement du rythme cardiaque – Cyanose (inconstante) – Hypotension artérielle – Convulsions (rares) – Hypothermie – État stuporeux ou coma sans réflexes – Parfois décès en l'absence de traitement par arrêt cardiaque consécutif à l'apnée ou OAP	– Mydriase (dilatation des pupilles) – « chair de poule », tremblements et frissons – Hypersudation – Spasmes et douleurs musculaires – Vomissements, diarrhées – Douleurs intestinales et coliques – Bâillements incoercibles – Accélération du rythme cardiaque – Angoisse, dépression, insomnie, nervosité

…/…

Substances psychoactives	Principaux signes d'intoxication aiguë	Principaux signes de sevrage dans le cadre d'une consommation addictive
Cocaïne et crack, amphétamines	– Mydriase – Accélération du rythme respiratoire – Hypertension parfois importante, crises d'angor (« angine de poitrine »), troubles du rythme cardiaque (souvent ralentissement) – Réflexes tendineux augmentés – Hyperthermie – Sécheresse buccale – Tremblements et convulsions – Crises paranoïaques, souvent violentes, alternant avec des phases de lucidité – Coma après épuisement extrême – Décès possible par collapsus cardiovasculaire en l'absence de traitement	*La dépendance est essentiellement psychique, mais certains auteurs rapportent des signes plus spécifiques pouvant en fait signer un manque dans un cadre de polytoxicomanie :* – douleurs musculaires et abdominales – frissons – sensation de faim – sommeil anormalement prolongé – dépression nerveuse – risque suicidaire.
MDMA (ecstasy) et autres phényléthylamines	– Mydriase (dilatation des pupilles) – Nervosité, attaque de panique – Hypertension, tachycardie – Syndrome d'hypersérotoninergie – Hyperthermie fulminante – Décès possible à des doses variables, par hyperthermie ou collapsus cardiovasculaire (rôle aggravant de la fatigue et la déshydratation)	– Absence de signes spécifiques, lorsque la consommation n'est pas abusive ou inscrite dans une pratique de polytoxicomanie – Signes identiques à ceux mentionnés pour les amphétamines lorsque la consommation se pérennise
Hallucinogènes (LSD, phencyclidine, mescaline, psilocybine, etc.)	– Mydriase (dilatation des pupilles) – Hypertension – Hyperthermie (inconstante) – Vasodilatation au niveau du visage (parfois) – Anxiété, panique, état paranoïaque, épisode psychotique plus ou moins prolongé – Illusions sensorielles diverses (non constant) – Dépersonnalisation	Aucun (les manifestations parfois rapportées traduisent une dépendance psychologique) sauf avec la PCP (fixation sur récepteurs de type NMDA)
Solvants organiques	– Tableau variable selon les produits, avec dominante de signes neurologiques (incoordination motrice, convulsions), cardiaques (troubles du rythme) et pulmonaires (apnée) – Décès par collapsus cardiovasculaire ou « sudden sniffing death »	Nervosité, malaise, décrits de façon très inconstante

L'essentiel de la question

- La notion de « drogue » est étroitement liée à un contexte historique, social et économique. Les classifications les plus récentes proposent d'établir une distinction entre modes de consommation et non plus entre produits consommés. De fait, alcool, tabac et médicaments psychotropes posent, dans nos sociétés, l'essentiel des problèmes sociaux liés à l'abus de substances psychoactives ou à la pharmacodépendance bien qu'ils ne soient pas considérés comme des stupéfiants.

- Le cannabis et ses dérivés ont une toxicité variable selon la vulnérabilité du consommateur. Les troubles, s'ils sont initialement réduits, peuvent s'aggraver sur le plan psychique lorsque l'usage se chronicise. L'utilisation systématisée de cannabis diminue les performances mnésiques du sujet et peu susciter un désintérêt pour ce qui l'environne. L'usage du cannabis ne donne que rarement lieu à dépendance physique.
- Divers opiacés dont notamment l'héroïne (diacétylmorphine) sont utilisés par les toxicomanes et caractérisés par l'importance de la dépendance physique comme psychique dans laquelle leur usage ne tarde pas à enfermer le sujet. Les antagonistes opiacés sont administrés dans le cadre du traitement d'urgence de l'intoxication aiguë et certains opiacés bénéficient d'une AMM dans le cadre des traitements de substitution (méthadone, buprénorphine).
- La cocaïne et son dérivé fumable, le crack, sont des drogues très toxiques, exposant à des troubles psychiques et somatiques majeurs : réactions paranoïdes et d'agressivité, troubles du rythme cardiaque, hypertension. Le traitement de l'intoxication est purement symptomatique.
- Amphétamines et ecstasy partagent de nombreuses propriétés pharmacologiques. Leur usage n'est pas anodin et, même, exposerait à une dégénérescence neuronale spécifique avec la MDMA et ses dérivés. Le traitement de l'intoxication est purement symptomatique.
- Le LSD est un hallucinogène de synthèse dont l'utilisation, même ponctuelle, peut exposer à un risque de décompensation psychotique chez des sujets vulnérables ou ayant des antécédents psychiatriques.

Pour en savoir plus

- Angel P., Richard D., Valleur M., Chagnard E. *Toxicomanies*. Masson, 2005.
- Aucremanne J.-L. *Drogues et substitution : traitements et prise en charge du sujet*. De Boeck Université, 2006.
- Collectif. *Ecstasy*. Rapport, Inserm, 1997.
- Collectif. *Stratégies thérapeutiques pour les personnes dépendantes des opiacés : place des traitements de substitution*. Conférence de consensus, Anaes, 2004.
- Ehrenberg A. *Drogues et médicaments psychotropes : le trouble des frontières*. Esprit, 1998.
- Geismar-Wieviorka S., Guionnet C., Guis G. *La Méthadone*. PUF, « Que sais-je ? », 1997.
- Laure P. *Le Dopage*. PUF, 1995.
- Laure P. *Les Gélules de la performance*. Ellipses, 1997.
- Lowenstein W., Sanchez M. *Addictions aux opiacés et traitements de substitution*. John Libbey Eurotext, 2003.
- Reynaud M. (directeur), *Traité d'addictologie*, Flammarion, 2006
- Richard D., Senon J.-L. *Dictionnaire des drogues, toxicomanies et dépendances*. Larousse, 2004.
- Roques B. *La Dangerosité des drogues*. Odile Jacob, 1999.

Toxicité des neuroleptiques

D. ERNOUF, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, Tours.
F. COUDORE, Laboratoire de toxicologie, faculté de pharmacie, Clermont-Ferrand.

Les neuroleptiques (NL) sont des médicaments psychotropes psycholeptiques à effets antipsychotiques associés à des effets sédatifs et désinhibiteurs plus ou moins marqués. Ils sont principalement utilisés dans le traitement des psychoses aiguës ou chroniques telles que la schizophrénie. Le premier neuroleptique, la chlorpromazine, a été commercialisé en 1952. Depuis, de nombreux autres principes actifs sont apparus, il existe actuellement (01/2007) 23 dénominations communes de neuroleptiques, utilisés comme psycholeptiques, au dictionnaire Vidal®. La diversité de ces composés, tant sur le plan chimique que sur le plan pharmacologique, a nécessité la mise en place de classifications.

I. Structure. Classification

La classification la plus commune est chimique, séparant les neuroleptiques en six familles dont les dénominations communes sont les suivantes (en *italique* figurent les molécules clés de chaque famille) :
- **phénothiazines** : *chlorpromazine*, cyamémazine, fluphénazine, lévomépromazine, perphénazine, pipotiazine, propériciazine ;
- **butyrophénones** : dropéridol, *halopéridol*, penfluridol, pipampérone ;
- **benzamides** : amisulpride, *sulpiride*, sultopride, tiapride ;
- **diazépines et oxazépines** : *clozapine*, loxapine, olanzapine ;
- **thioxanthènes** : *flupentixol*, zuclopenthixol ;
- **autres** : *rispéridone*, pimozide, aripiprazole.

La classification pharmacologique est difficile, elle fait appel à l'importance respective des effets antipsychotiques, sédatifs et désinhibiteurs de chaque molécule, ceux-ci variant en fonction de la dose utilisée. Citons quelques exemples :
- effet antipsychotique marqué : halopéridol, clozapine, pipotiazine,
- effet sédatif : la plupart des phénothiazines (chlorpromazine, cyamémazine), zuclopenthixol ; à fortes posologies, tous les neuroleptiques sont cependant sédatifs,
- effet désinhibiteur : sulpiride, pipotiazine, fluphénazine.

Pour d'autres médicaments de structures proches, l'effet neuroleptique n'intervient qu'au niveau des effets indésirables. C'est le cas de certains antihistaminiques H_1 (prométhazine, alimémazine), antinaupathiques (métoclopramide, métopimazine) ou médicament à visée vasomotrice (véralipride).

II. Rappel sur le mécanisme d'action des neuroleptiques

Les cibles neurochimiques des neuroleptiques concernent les systèmes dopaminergique, cholinergique, adrénergique, histaminergique et sérotoninergique, où ils exercent des actions antagonistes. Ce sont les posologies, affinités et intensités d'action au niveau des récepteurs de ces systèmes qui vont déterminer pour chaque

médicament ses effets principaux, secondaires et toxiques. La principale propriété des neuroleptiques est de bloquer les récepteurs dopaminergiques centraux (D1 à D5). L'effet antipsychotique est dû à l'antagonisme au niveau des récepteurs D2 postsynaptiques *des structures* mésolimbique et mésocorticale. Le blocage des récepteurs dopaminergiques des centres du vomissement, aux niveaux tubéro-infundibulaire et nigrostrié, est responsable des effets antinauséeux, hyperprolactinémiant et bien sûr extrapyramidaux. Le blocage du système cholinergique (muscarinique) est à l'origine de syndromes confusionnels, rétention urinaire, constipation, sécheresse buccale et hyperthermie. Au niveau des récepteurs alpha-adrénergiques centraux et périphériques, l'antagonisme induit une sédation et la possibilité d'hypotension orthostatique. L'action antagoniste H_1 au niveau du cortex est également un facteur déterminant de la sédation induite par les neuroleptiques. Le blocage au niveau des récepteurs sérotoninergiques (5-HT) participe également à l'action antipsychotique par modification de libération de la dopamine. Certains neuroleptiques possèdent cette action marquée notamment au niveau 5-HT2 (2A et 2C). Cette intéressante propriété va limiter les effets secondaires dus à l'inhibition des récepteurs D2 nigrostriés, hypothalamo-hypophysaires et méso-corticaux. Ainsi, les neuroleptiques dits « atypiques » sont ceux pour lesquels le rapport des affinités 5-HT2/D2 est grand, supérieur à 1. Ils entraînent moins d'effets indésirables (notamment extrapyramidaux) en conservant une action antipsychotique identique, voire supérieure, aux neuroleptiques conventionnels dans la schizophrénie sur les symptomatologies positives et déficitaires. La clozapine, l'olanzapine, la rispéridone, et plus en retrait l'amisulpride, entrent dans la définition des neuroleptiques atypiques (absence d'effets extrapyramidaux, absence d'hyperprolactinémie, efficacité sur les symptômes négatifs et dans les formes résistantes).

III. Étiologies des intoxications

A. Intoxications aiguës

Si les psychotropes sont les plus utilisés dans les conduites autolytiques médicamenteuses, la fréquence des prises de neuroleptique est largement dépassée par celles des anxiolytiques-hypnotiques et des antidépresseurs. Les neuroleptiques n'interviennent en effet que dans environ 5 % des tentatives de suicide médicamenteux. Elles concernent principalement les adultes jeunes, surtout les femmes pour environ deux tiers des cas, traités par ces médicaments. Les malades atteints de psychoses sont des sujets à risque accru de conduites suicidaires. Les traitements médicamenteux permettent cependant de réduire ce risque, notamment en régulant la composante dépressive, parfois en associant des antidépresseurs aux neuroleptiques. Ces associations doivent cependant faire prendre en considération que la levée de l'inhibition peut favoriser le passage à l'acte.
Les intoxications aiguës volontaires aux neuroleptiques ne concernent parfois qu'un principe actif, mais le plus souvent une association de psychotropes, les

malades psychotiques étant souvent polymédicamentés. L'association avec l'alcool est également fréquente. Dans ces cas, les effets dépresseurs du système nerveux central des autres xénobiotiques potentialisent ceux des neuroleptiques ingérés à doses massives. Soulignons ici l'implication particulière de deux spécialités hypnotiques contenant des phénothiazines et des anxiolytiques associées : acéprométazine et méprobamate pour l'une, et acépromazine, acéprométazine et clorazépate pour l'autre. Ces associations sont hypnotiques par potentialisation de leurs effets sédatifs et peuvent en cas de prises massives conduire à de graves intoxications, surtout par l'intermédiaire du méprobamate. Il a été décrit quelques cas de mort subite induite par un traitement par le dropéridol, qui est souvent utilisé dans les services d'urgence pour calmer rapidement des malades très agités. Après prise de substances psychoactives comme la cocaïne, les amphétamines ou la phencyclidine, le dropéridol, probablement en allongeant l'intervalle QT, comme ces toxiques, a été identifié comme responsable potentiel de décès.
Les intoxications aiguës pédiatriques sont encore plus rares. Elles peuvent cependant se rencontrer lors d'un surdosage, induit par l'entourage, en phénothiazines antihistaminiques H1, lors de l'utilisation de celles-ci comme sédatif ou hypnotique en sirops (prométhazine et alimémazine). Ces intoxications sont généralement bénignes, les quantités ingérées étant le plus souvent limitées. L'alimémazine a été décrite comme facteur pouvant favoriser la mort subite du nourrisson.

B. Intoxications chroniques

Ces intoxications sont fréquentes et correspondent à l'exagération des effets secondaires, surtout extrapyramidaux (hyperkinésie, dyskinésies), particulièrement marqués avec les neuroleptiques classiques. On observe aussi des effets psychiatriques (somnolence, dépression), des signes neurovégétatifs (hypotension orthostatique). Ces signes, qui peuvent survenir à n'importe quel moment d'un traitement au long cours, sont cependant plus fréquents au début de celui-ci. Leur prévention n'est pas toujours facile malgré les adaptations posologiques car il existe de grands facteurs de sensibilité interindividuelle (âge, insuffisance hépatique, associations avec des xénobiotiques divers...). De plus, il n'existe pas toujours une bonne corrélation entre l'efficacité thérapeutique et la survenue de ces effets indésirables. Le traitement ne peut être que préventif : limitation de l'utilisation des neuroleptiques au traitement des psychoses, prescription si possible transitoire. Les autres manifestations indésirables telles que la rétention urinaire, la constipation et la sécheresse buccale traduisent cependant une bonne efficacité thérapeutique.
Le syndrome malin, rare mais toujours grave, semble pouvoir être provoqué *de manière brutale* par tous les neuroleptiques mais surtout par les phénothiazines et les butyrophénones utilisées de façon chronique. L'étiologie précise de ce syndrome est encore mal connue, ce qui impose une vigilance accrue dans la notification des premiers signes cliniques, les sensibilités individuelles sont là encore importantes.
Soulignons enfin que les neuroleptiques, bien que psychotropes, ne se prêtent pas ou qu'exceptionnellement à des conduites addictives. Leur utilisation, assez rare chez le toxicomane, se limite à la gestion du manque de la substance psychoactive responsable de la dépendance. C'est l'effet sédatif qui est alors le plus souvent recherché.

IV. Toxicocinétique

La diversité structurale des médicaments neuroleptiques complique leur étude toxicocinétique, c'est la raison pour laquelle nous donnerons les grandes lignes de leurs points communs puis les particularités des différentes classes chimiques.

A. Points communs

1. Absorption

Après ingestion, les neuroleptiques sont principalement résorbés au niveau de l'intestin grêle. Leur diffusion se fait sous forme non ionisée en milieu légèrement alcalin par un mécanisme de transfert passif. La vitesse de résorption dépend de la liposolubilité de la molécule considérée, ce sont les dérivés phénothiaziniques qui sont généralement le plus rapidement résorbés. Pour la plupart des neuroleptiques utilisés à doses pharmacologiques, les pics plamatiques sont atteints entre 2 et 4 heures. L'ingestion de doses importantes et les propriétés anticholinergiques marquées de certains médicaments retardent ce délai.

2. Distribution

Le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques est variable mais souvent supérieur à 90 %. Ces liaisons se font surtout au niveau de l'albumine avec une assez faible affinité mais un nombre élevé de sites de fixation et de façon moins importante au niveau de l'alpha-1-glycoprotéine acide. Les neuroleptiques peuvent également se fixer sur certaines lipoprotéines plasmatiques avec une grande affinité, fonction de leur lipophilie, mais avec un faible nombre de sites de fixation. La distribution tissulaire des neuroleptiques est élevée sans tropisme très marqué, la vascularisation des tissus et leur teneur en lipides sont les deux facteurs favorisants. Les neuroleptiques franchissent facilement les différentes barrières de l'organisme, notamment la barrière hémato-encéphalique. Les poumons, le foie, les reins et le cerveau sont les organes où la fixation tissulaire est la plus grande. Ainsi, les concentrations cérébrales sont souvent dix fois supérieures aux concentrations plasmatiques, qui sont pratiquement toujours très inférieures à 0,5 mg/L aux posologies thérapeutiques. Les volumes de distribution (Vd) peuvent être très élevés et sont généralement compris entre 2 et 20 L/kg. L'importance des volumes de distribution, de la fixation protéique et de la lipophilie des neuroleptiques rend inutiles les tentatives d'éliminations rénales ou extrarénales (hémodialyse, dialyse péritonéale) en cas d'intoxication aiguë.

3. Métabolisme

Le métabolisme des neuroleptiques, essentiellement hépatique, est complexe. Les réactions enzymatiques de phase I interviennent soit au niveau des chaînes latérales carbonées ou à celui des noyaux aromatiques et hétérocycliques. Les réactions de N-désalkylation, parfois oxydatives, sont également fréquentes. Il existe des réac-

tions de N- et S-oxydations. Les réactions de phase I sont catalysées par des cytochromes P450. Pour beaucoup de neuroleptiques, l'effet de premier passage hépatique est assez important. La biodisponibilité par voie orale est comprise entre 40 et 80 %. Elle augmente avec l'importance des quantités ingérées. Les réactions de conjugaisons (surtout glucurono et sulfoconjugaisons) s'effectuent sur les groupements plus hydrophiles précédemment créés. Beaucoup de métabolites de phase I, notamment les dérivés N-désalkylés ou hydroxylés, sont actifs pharmacologiquement et peuvent donc prolonger les effets toxiques de la molécule initiale. Les demi-vies d'élimination sont extrêmement variables, entre 3 et 70 heures aux concentrations thérapeutiques, supérieures en cas de saturation enzymatique à dose toxique.

4. Élimination

L'élimination est urinaire pour les conjugués inactifs, biliaire et fécale pour les dérivés plus lipophiles encore potentiellement actifs, avec possibilité d'un cycle entérohépatique. Le très grand volume de distribution de certains neuroleptiques fait qu'il est possible de retrouver des traces de métabolites urinaires plusieurs semaines après la dernière prise du médicament.

B. Phénothiazines

La chlorpromazine est le neuroleptique phénothiazinique le mieux étudié sur le plan cinétique. La liaison aux protéines plasmatiques est voisine de 95 %, les volumes de distribution sont compris entre 10 et 35 L/kg. Les réactions métaboliques la concernant sont nombreuses, catalysées par les CYP1A1, 2D6 et 3A4. Tous les médicaments de cette classe subissent le même type de biotransformations : S- et N-oxydations, N-mono- ou bidéméthylations, hydroxylations en 3, 7 ou 8 sur les noyaux aromatiques. Une désamination oxydative est également possible. Pour la chlorpromazine, il est décrit plus de cent métabolites. Les dérivés N-déméthylés et 7-hydroxylés sont actifs. Dans le cas des phénothiazines à radical pipérazine, celui-ci peut-être oxydé ou séparé de la molécule mère (cas de la fluphénazine par exemple). Si la demi-vie plasmatique de la chlorpromazine est comprise entre 16 et 30 heures, sa rémanence dans l'organisme est beaucoup plus longue : plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

C. Butyrophénones

Dans cette classe, la cinétique de l'halopéridol a été la plus étudiée. Le métabolisme hépatique est sous la dépendance des CYP3A4 et 2D6. L'une des particularités métaboliques est la possibilité de formation d'un dérivé réduit (au niveau de la fonction cétone par une carbonylréductase à NADPH), moins actif mais qui peut s'oxyder pour redonner l'halopéridol. Les autres voies cataboliques sont une glucuronoconjugaison, une N-désalkylation et la formation d'un dérivé pyridiné. Le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques est voisin de 92 %, le volume de distribution compris entre 2 et 25 L/kg. À posologies thérapeutiques la demi-vie est voisine de 18 heures. Les autres butyrophénones, pipampérone, penfluridol et dropéridol, ont des paramètres cinétiques peu différents de l'halopéridol.

D. Benzamides

La vitesse de résorption des benzamides est proche de celle des autres neuroleptiques pour l'amisulpride et le tiapride, et plus lente pour le sulpiride, pour lequel le pic plasmatique est atteint vers la 6e heure à doses pharmacologiques. La biodisponibilité de ces neuroleptiques est voisine de 30 à 40 %, le taux de fixation aux protéines plasmatiques est de 40 % et le volume de distribution est compris entre 1 et 2,5 L/kg (environ 12 L/kg pour l'amisulpride). Les benzamides, notamment le sulpiride, n'ont pratiquement pas de métabolisme hépatique, leur élimination est essentiellement rénale. Les demi-vies d'élimination sont comprises entre 6 et 8 heures, l'insuffisance rénale peut les augmenter.

E. Thioxanthènes

Du point de vue de leurs structures, les thioxanthènes sont assez proches des phénothiazines. Leur métabolisme est voisin mais avec une absence presque totale d'hydroxylation sur les cycles aromatiques. La sulfoxydation et une N-désalkylation sont les réactions dominantes. Le zuclopenthixol subit une glucuronoconjugaison. La biodisponibilité est voisine de 40 %. Il ne semble pas y avoir de métabolites actifs. Les demi-vies plasmatiques sont comprises entre 15 et 35 heures. Le flupentixol a un cycle entérohépatique important.

F. Diazépines et oxazépines

La clozapine, l'olanzapine et à un moindre degré la loxapine font partie des neuroleptiques atypiques. Les biodisponibilités sont comprises entre 50 et 80 %, la liaison aux protéines plasmatiques est importante, proche de 95 %. Les volumes de distribution varient de 5 L/kg (clozapine) à 20 L/kg (olanzapine). Le métabolisme hépatique est régi par les CYP1A2, 3A4 et 2D6. Les principaux métabolites sont des formes hydroxylées et/ou N-déméthylées dont certaines sont actives : 7 et 8-hydroxyloxapine, N-desméthylolanzapine, N-desméthylclozapine. Les dérivés N-oxydés ou les glucuroconjugués sont inactifs. Les demi-vies de ces neuroleptiques sont variables, 8 heures pour la loxapine (les métabolites actifs prolongent la durée d'action), 16 heures pour la clozapine et 35 heures pour l'olanzapine.

G. Autres

La rispéridone, autre neuroleptique atypique, a une biodisponibilité proche de 70 %, un taux de fixation aux protéines d'environ 90 % et un volume de distribution compris entre 1 et 1,5 L/kg. Son métabolisme est principalement dû au CYP2D6 avec formation de 9-hydroxyrispéridone, qui est aussi active que la molécule mère. Les dérivés 7-hydroxy et glucuroconjugués sont inactifs. La demi-vie d'élimination est d'environ 24 heures. La demi-vie du pimozide est voisine de 50 heures, ce qui facilite son accumulation. Son principal métabolite est le N-désalkyloxyde, qui est inactif.

L'aripiprazole, dont le volume de distribution est proche de 5 L/kg, est très lié aux protéines (99 %). Sa demi-vie est voisine de 75 heures. Il est biotransformé par les CYP3A4 et 2D6. Le déhydro-aripiprazole est un métabolite actif.

V. Mode d'action toxique

A. Neuroleptiques classiques

Les neuroleptiques classiques agissent comme antidélirants et antihallucinatoires par le blocage qu'ils exercent sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques. Cependant, le blocage des trois autres voies dopaminergiques centrales, mésocorticale, nigrostriée et tubéro-infundibulaire, est à l'origine des effets indésirables.
Comme tous les neuroleptiques classiques ne bloquent pas de la même manière les différents récepteurs impliqués dans leurs effets pharmacologiques, les effets à doses toxiques seront fonction du groupe pharmacologique auquel appartient la molécule responsable. Les phénothiazines, considérées comme moins toxiques, causent principalement des troubles neurologiques. Lors d'une intoxication par un neuroleptique classique, des effets communs liés au blocage des différents récepteurs sont retrouvés :

- parkinsonisme iatrogène : blocage des récepteurs D2 nigrostriés. Comme la voie nigrostriée se projette sur les ganglions de la base appartenant au système extrapyramidal, ces effets sont appelés « symptômes extrapyramidaux ». Comme les muscles de la tête et du cou sont souvent atteints, on observe des troubles hyperkinétiques tels que spasmes du cou, mâchonnements, protrusion linguale ;
- aggravation des symptômes cognitifs d'une schizophrénie préexistante (troubles du cours de la pensée, bizarrerie du langage) : blocage des récepteurs D2 mésocorticaux ;
- somnolence, bouche sèche, mydriase : blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques ;
- hypotension orthostatique, vertiges : blocage des récepteurs adrénergiques $\alpha1$ périphériques ;
- somnolence : blocage des récepteurs histaminiques H_1 et $\alpha1$ centraux.

B. Neuroleptiques atypiques

Ils agissent par le blocage simultané de sous-types de récepteurs 5-HT et dopaminergiques, les sous-types 5-HT2A et D2. Cela entraîne un faible nombre d'effets indésirables extrapyramidaux, pas de dyskinésie tardive et pas d'hyperprolactinémie. Cependant, ce mécanisme utilisant la voie sérotoninergique ne semble pas univoque. Les caractéristiques de la liaison au récepteur D2 pourraient varier selon les molécules ; ainsi, à fortes doses, certains neuroleptiques atypiques perdent leur spécificité.

De plus, les neuroleptiques atypiques agissent sur d'autres récepteurs, noradrénergiques α1 et α2, cholinergiques muscariniques, histaminiques H1. Ils possèdent un mélange de propriétés complexes et chaque neuroleptique atypique est différent de l'autre.

VI. Symptomatologie des intoxications

A. Intoxications aiguës par les neuroleptiques classiques

Lors d'intoxications par les neuroleptiques classiques on observe de manière générale :
- une dépression du système nerveux allant de la somnolence au coma ;
- des effets atropiniques (tachycardie, agitation, confusion, mydriase) ;
- des troubles de la régulation de la température (hypothermie) et de la pression artérielle (hypotension) ;
- des réactions extrapyramidales sévères (rigidité musculaire, tremblements localisés ou généralisés).

L'activité spécifique de la molécule responsable ainsi que les associations médicamenteuses peuvent faire varier l'intensité des manifestations décrites ci-dessus ou modifier certains symptômes :
- coma calme, profond avec les neuroleptiques sédatifs à chaîne aliphatique ou pipéridinée (chlorpromazine, lévomépromazine) ou hypertonique avec accès de rigidité avec les neuroleptiques à chaîne pipérazinée (fluphénazine), ou les butyrophénones ;
- tachycardie (neuroleptiques sédatifs, sulpiride, sultopride), troubles de la conduction (thioridazine), troubles du rythme (amisulpride, sulpiride, sultopride) et en particulier allongement du QT et torsades de pointes avec risque de mort subite ;
- dépression respiratoire avec risque d'inhalation (phénothiazines, butyrophénones) ;
- cholestase avec la chlorpromazine.

Les complications les plus graves sont convulsions, arythmie, état de choc, coma.

B. Intoxications aiguës par des neuroleptiques atypiques

La plupart des décès entraînés par une intoxication aiguë par un neuroleptique atypique chez des patients antérieurement exposés proviennent d'une décompensation cardiaque ou d'une pneumopathie d'inhalation. Chez les sujets non précédemment exposés, les symptômes observés et les doses responsables sont très variables d'une molécule à l'autre (*tab. 1*). De plus, on retrouve une très grande variabilité inter- et intra-individuelle.

La clozapine peut provoquer une agranulocytose, une myocardite et, comme la rispéridone, une intolérance au glucose.

Tableau 1. Doses toxiques et signes des intoxications aiguës aux neuroleptiques atypiques

	Doses toxiques	Signes décrits
Clozapine	400 mg à 2 g (adulte) 50 à 100 mg (enfant)	Altération de la conscience, sédation, coma Tachycardie, hypotension, arythmie ventriculaire Hypersalivation Phénomènes inflammatoires et/ou pseudo-infectieux
Olanzapine	40 à 1 000 mg	Fluctuations imprévisibles entre dépression du SNC et agitation Détresse respiratoire
Rispéridone	20 à 300 mg	Sédation, symptômes extrapyramidaux Tachycardie et hypotension, allongement du QT, torsades de pointes

C. Syndrome malin des neuroleptiques

Les intoxications chroniques ne sont que des traductions importantes des effets secondaires. Le syndrome malin doit être cependant isolé de celles-ci.
Ce syndrome survient en général dans les premières semaines d'un traitement par les neuroleptiques, parfois indépendamment de la dose. Il semble plus fréquent avec l'halopéridol et les neuroleptiques retard. Les signes cliniques évocateurs sont : hyperthermie (38,5 à 42 °C), sueurs abondantes, déshydratation avec possibilité d'anurie, tachycardie, polypnée, raideur extrapyramidale marquée, trismus, douleurs diffuses. Les troubles de la conscience sont constants avec au minimum une confusion.
Sur le plan biologique, il est noté des signes de déshydratation (hyperprotidémie, hypernatrémie), de rhabdomyolyse (élévation des CK, myoglobinurie possible), d'insuffisance rénale due aux deux phénomènes précédents (avec élévation de la kaliémie et de la créatininémie), acidose métabolique secondaire à la rhabdomyolyse et à l'insuffisance rénale.
Les intoxications aiguës à la cocaïne et à l'ecstasy, au lithium, à la strychnine, le tétanos et la crise aiguë thyréotoxique font partie des diagnostics différentiels.

VII. Toxicologie analytique

La toxicologie analytique des neuroleptiques est la plus complexe de celles des psychotropes. Il existe en effet une grande diversité de structures chimiques des principes actifs, ce qui empêche la commercialisation de kits de dosage avec anticorps spécifiques. En raison des grands volumes de distribution, les concentrations sanguines, même toxiques, sont assez faibles, et il n'existe pas de réelles corrélations entre les taux toxiques et la symptomatologie. Certains neuroleptiques ont des métabolites très actifs (toxiques), d'autres non. Enfin, la connaissance de ces taux n'a pas beaucoup d'incidence sur la conduite thérapeutique.
En pratique hospitalière courante, c'est donc plus souvent l'aspect qualitatif, pour confirmer ou infirmer la réalité d'une intoxication, que quantitatif qui est recherché.
Les neuroleptiques, principes actifs aminés, sont classiquement extraits en milieu alcalin. Les méthodes les plus anciennes, mais qui peuvent encore très rapidement certifier la prise de neuroleptiques, ont été décrites pour les phénothiazines. Elles

donnent avec les sels ferriques et les acides minéraux forts des colorations roses à violettes en fonction de la nature de la molécule et de sa concentration. L'identification de cette classe de neuroleptiques est ainsi très facile à partir de liquides gastriques ou d'urine. La sensibilité analytique est trop faible pour une détection sérique. De nombreux protocoles de chromatographie en couche mince avec détection ultraviolette ou colorée ont été décrits pour permettre une meilleure approche qualitative.
Dans le sang (et les autres milieux biologiques), l'identification et le dosage des neuroleptiques sont possibles par chromatographie en phase gazeuse (avec colonne capillaire, détecteur d'azote ou spectrométrie de masse) ou chromatographie liquide (avec détecteur à barrette de diodes ou spectrométrie de masse). Ces méthodes sont d'utilisation peu fréquente en pratique courante à l'exception de celle d'appareil de chromatographie liquide automatisée. Les dosages sont possibles au niveau des cheveux mais ne s'accordent pas avec les intoxications aiguës.

VIII. Traitement des intoxications

Le traitement doit être conduit en milieu hospitalier et toute association médicamenteuse doit être systématiquement recherchée. Il consiste en :

- l'administration précoce de charbon activé, le lavage gastrique (après intubation si le patient est inconscient) devant être discuté en fonction du rapport bénéfice/risques du geste ;
- la surveillance des fonctions cardiaque, respiratoire et de la température ;
- le traitement symptomatique des éventuels troubles du rythme et de la conduction, des troubles tensionnels, des convulsions et du collapsus.

Il n'existe pas d'antidote. La surveillance doit être prolongée en cas de possible toxicité retardée ou prolongée (clozapine).
La prise en charge du syndrome malin est essentiellement symptomatique et est la suivante : hospitalisation, réhydratation, refroidissement externe, antibiothérapie préventive à visée pulmonaire (amoxicilline-acide clavulanique ou pristinamycine), sédation par le diazépam ou le clorazépate, analgésie par le paracétamol le plus souvent. Le dantrolène, myorelaxant à action directe, est utilisé contre la rigidité extrapyramidale (et l'hyperthermie). La bromocriptine peut être prescrite pour son action dopaminergique.

L'essentiel de la question

Les neuroleptiques (NL) sont des médicaments psychotropes psycholeptiques à effets antipsychotiques. Ils ont des effets sédatifs et désinhibiteurs variables. Leur classification la plus commune est chimique séparant les neuroleptiques en six sous-groupes : phénothiazines, butyrophénones, benzamides, thioxanthènes, diazépines et oxazépines, et autres. Leurs effets toxiques sont dus à l'exagération de leurs effets antagonistes sur les récepteurs dopaminergiques, cholinergiques, adrénergiques, histaminergiques et sérotoninergiques. Les intoxications aiguës se rencontrent surtout

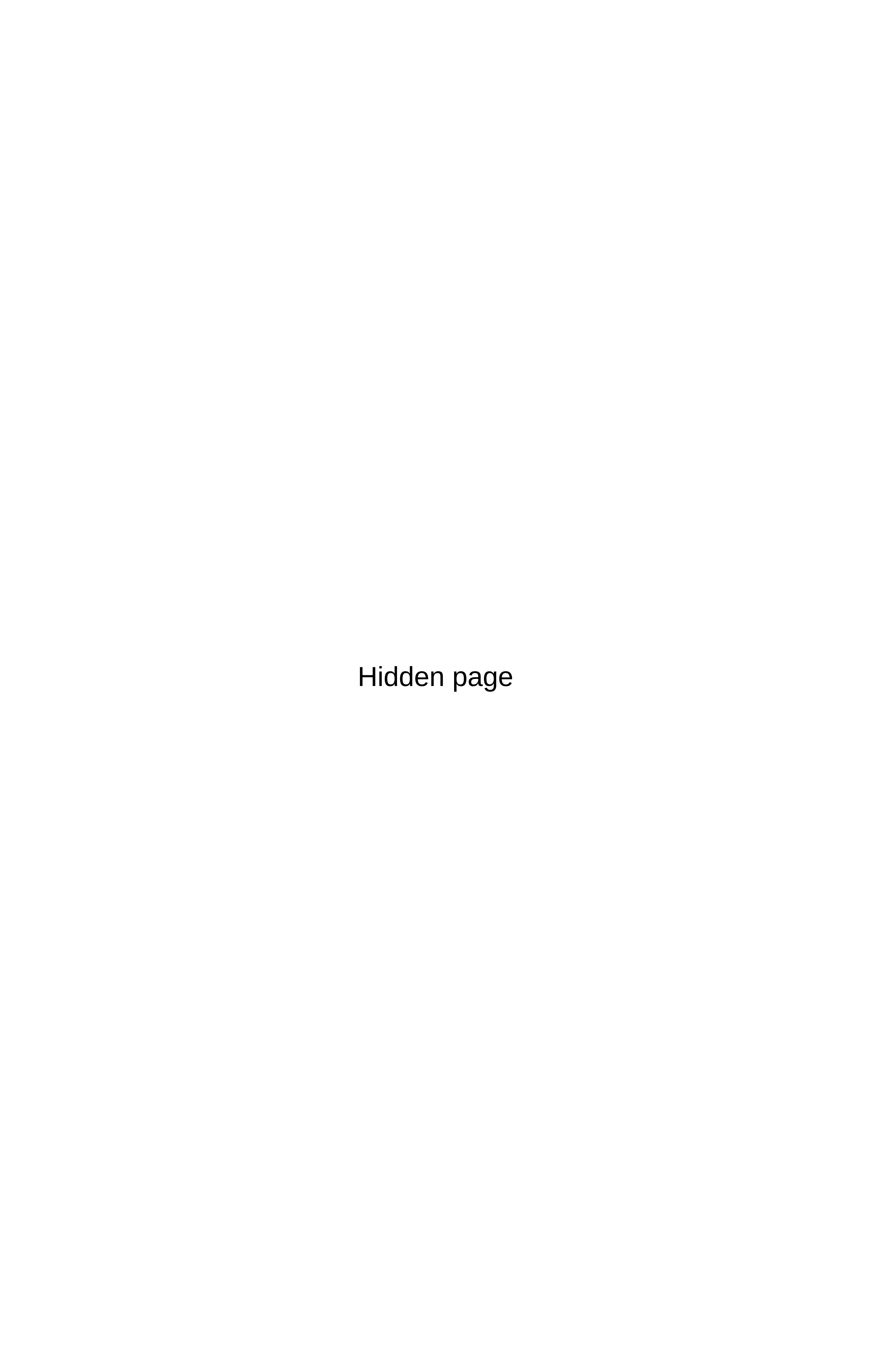
dans les conduites autolytiques dans lesquelles les neuroleptiques sont souvent associés à d'autres xénobiotiques psychotropes. Les intoxications chroniques sont le fait de la traduction marquée de certains de leurs effets secondaires notamment extrapyramidaux.
Les neuroleptiques sont assez bien absorbés au niveau intestinal et ont des pourcentages de liaisons protéiques et des volumes de distribution souvent importants. Leur métabolisme est essentiellement hépatique, catalysé par les CYP, et porte sur les chaînes latérales carbonées et les noyaux aromatiques ou hétérocycliques. Beaucoup de métabolites N-désalkylés ou hydroxylés sont actifs. Les demi-vies sont très variables (de 3 h à 70 h environ). L'élimination est rénale pour les dérivés hydrosolubles (conjugués). Il existe un cycle entérohépatique pour les dérivés les plus lipophiles.
Les effets à doses toxiques sont fonction du groupe pharmacologique auquel appartient la molécule responsable. Lors d'intoxications aiguës par les neuroleptiques classiques, on observe de manière générale : une dépression du système nerveux, des effets atropiniques, des troubles de la régulation de la température et de la pression artérielle, des réactions extrapyramidales sévères. Dans le cas de neuroleptiques atypiques, les symptômes observés, surtout neurologiques et cardiaques, et les doses responsables sont très variables d'une molécule à l'autre et d'un patient à l'autre.
Les intoxications chroniques sont les plus fréquentes et correspondent à l'exagération des effets secondaires surtout extrapyramidaux, particulièrement marqués avec les neuroleptiques conventionnels. Les neuroleptiques atypiques, au moins pour la clozapine, induisent moins d'effets extrapyramidaux. Le syndrome malin, rare mais toujours grave, pourrait être provoqué par tous les neuroleptiques.
La toxicologie analytique est assez complexe. Les méthodes chromatographiques gazeuses ou liquides sont envisageables mais leurs résultats chiffrés n'ont souvent que peu d'incidence sur la prise en charge thérapeutique.
Le traitement des intoxications aiguës est évacuateur et symptomatique, effectué en milieu hospitalier, toute association médicamenteuse ou alcoolique devant être systématiquement recherchée.

Pour en savoir plus

- Bordet R. Neuroleptiques ou antipsychotiques ? *La Lettre du pharmacologue* 2003 ; 18 (3) : 81-6.
- Burns M.J. The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. *J Toxicol Clinical Toxicology* 2001 ; 39 : 1-14.
- Danel V., Barriot P. « Intoxications aiguës par les psychotropes », in *Intoxications aiguës en réanimation*. Paris, Arnette, 1999 : 446-50.
- Haffen E., Sechter D. Prescription et surveillance des psychotropes. *La Revue du praticien* 2004 ; 54 : 1119-27.
- Senon J.-L. Pharmacocinétique des neuroleptiques. *Encéphale* 1990 ; 16 : 99-109.
- Stahl S.M. « Neuroleptiques et antipsychotiques », in *Psychopharmacologie essentielle*. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2002 : 401-59.

Remerciements à E. Rabut pour sa participation à la révision du manuscrit.

Toxicologie professionnelle


Hidden page

Toxicologie du benzène et homologues supérieurs

P. VASSEUR, UPRES EA 1100, « Écotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale », Université de Metz.
M. IMBENOTTE, F. ERB, Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.
J.-Y. LE TALAER, Département de Biochimie-Toxicologie, UFR de Pharmacie, Caen (révision 2007).

Le benzène est un excellent solvant des graisses, du caoutchouc, des peintures, longtemps utilisé en industrie pour ces propriétés. Sa toxicité pour la moelle osseuse et ses effets cancérogènes ont amené à réglementer sévèrement son utilisation en milieu professionnel et à restreindre son emploi au cas où le remplacement par des substituts est impossible. Le benzène reste très utilisé en industrie chimique comme matière première en synthèse organique. Avec plusieurs centaines de milliers de tonnes mises en œuvre chaque année, le benzène reste l'un des produits chimiques organiques les plus utilisés en France. Malgré la prévention, les cas de benzolisme sont encore d'actualité en milieu professionnel. La vigilance est de règle même avec des solvants de substitution comme ses homologues supérieurs qui peuvent renfermer du benzène en tant qu'impureté.

I. Benzène

Le Noir et Claude décrivaient, il y a près d'un siècle, le premier cas fatal de purpura et d'anémie aiguë liée à l'exposition au benzène ; l'aplasie médullaire (Seilling, 1911) et les leucémies aiguës (Delore et Borgonmano, 1928 ; Weil, 1932 ; Vigliami, 1938) liées à l'exposition professionnelle au benzène ont été rapportées ensuite. Les mesures de prévention individuelle et collective prises en milieu industriel à la suite de ces observations ont permis de réduire le risque de benzolisme, reconnu dès 1948 comme maladie professionnelle.
Les effets cancérogènes du benzène pour l'homme, longtemps soupçonnés, ont été démontrés formellement il y a une trentaine d'années (Cronkite, 1961). Le benzène est classé cancérogène – catégorie 1 – selon la classification de IARC (*International Agency for Research on Cancer*).
Le terme de benzolisme s'applique à l'intoxication provoquée par le benzène mélangé à ses homologues supérieurs (toluène, xylènes) ; il se différencie du benzénisme qui concerne l'intoxication due au benzène seul.

A. Propriétés physico-chimiques et utilisations

- formule C_6H_6 ;
- liquide incolore, odeur caractéristique ;
- point d'ébullition : 80 °C à 760 mmHg ;
- tension de vapeur élevée (volatilité très supérieure à celle de ses homologues supérieurs toluènes, xylènes) ;
- très inflammable ;
- mélangées à l'air, ses vapeurs sont explosives ;
- densité de vapeur élevée : 2,7 (air : 1) ;
- très peu soluble dans l'eau ;
- liposoluble, très miscible à l'alcool, l'éther, l'acétone, les corps gras ;
- excellent solvant des graisses, du caoutchouc, des vernis, des peintures, des colles et de nombreuses matières plastiques ;
- adsorbé par le charbon actif ;
- le benzène absorbe dans l'ultra-violet à 184, 204 et 254 nm ; il est à l'origine de réactions colorées permettant son identification : avec HNO_3 il y a formation de métadinitrobenzène donnant avec la butanone et la potasse, une coloration

rouge. Les dérivés métadinitrés du benzène sont insensibles à l'oxydation chromique (différence benzène – toluène).

Le benzène obtenu initialement par distillation de la houille est aujourd'hui produit à partir du pétrole par le procédé du « *steam-cracking* », sous forme :

- de produit pur ;
- ou mélangé à d'autres solvants.

Les *benzols* sont des mélanges d'hydrocarbures aromatiques, produits de distillation recueillis entre certaines marges de température. Ce sont des mélanges de benzène, toluène et xylènes. On distingue les benzols 90, 50 ou 0 selon que 90, 50 ou 0 % de leur volume distillent en dessous de 100 °C.

Les *toluols* contiennent essentiellement du toluène (moins de 2 % de benzène). Les *xylols* ne renferment pas de benzène.

Le terme de benzène doit être bien distingué du terme de benzine : produit de distillation du pétrole contenant principalement des hydrocarbures aliphatiques (hexane et heptane), mais qui peut contenir 2 à 5 % de benzène.

Le benzène est également ajouté dans les carburants comme améliorant de l'indice d'octane. Les essences automobiles contiennent actuellement jusqu'à 5 % de benzène – 2,3 % en moyenne selon un rapport de la Commission des communautés européennes en 1996. Elles peuvent donc émettre des vapeurs de benzène.

Les *essences spéciales* obtenues par distillation fractionnée du pétrole sont des mélanges d'hydrocarbures aliphatiques qui peuvent contenir du benzène, en particulier lorsqu'ils sont recueillis dans un intervalle de température de distillation assez bas (entre 40 °C et 100 °C). White-spirit et kérosène, qui en revanche distillent au-dessus de 135 °C, ne renferment pas de benzène.

Les propriétés exceptionnelles du benzène, en tant que solvant l'ont fait utiliser très tôt dans l'industrie du caoutchouc, des peintures, des vernis, des matières plastiques et en métallurgie. Il est remplacé maintenant dans ces usages par ses homologues supérieurs, ou d'autres solvants…

Le benzène reste très employé dans l'industrie chimique pour la synthèse de :

- hydrocarbures phénoliques, hydrocarbures alicycliques ;
- cétones ;
- styrène, précurseur dans la fabrication des matières plastiques (polystyrène), acrylonitrile, butadiène…
- chlorobenzènes utilisés pour la synthèse de pesticides ;
- amines aromatiques, colorants, médicaments, explosifs, détergents.

B. Toxicocinétique et métabolisme

a) L'inhalation par voie pulmonaire

C'est la voie de pénétration prépondérante, avec un stockage pulmonaire variant de 30 à 80 % de la quantité inhalée.

b) Le passage percutané

Il est loin d'être négligeable quand le benzène entre au contact de la peau (vêtements souillés, trempage des mains…).

Le benzène absorbé est transporté par le sang, fixé aux lipoprotéines plasmatiques et aux hématies. Du fait de sa lipophilie, il se distribue ensuite rapidement dans les

organes riches en lipides : foie, système nerveux, moelle osseuse, surrénales… Sa fixation dans les centres nerveux est préférentielle dans les intoxications massives ; en cas d'exposition chronique, elle sera essentiellement hépatique.

c) Les transformations métaboliques du benzène

Elles s'effectuent en majorité au niveau du foie, mais aussi dans les autres tissus où il s'est fixé : la moelle osseuse en particulier.

d) Les deux voies d'excrétion

Les plus importantes sont :

■ *La voie respiratoire*

Avec élimination du benzène non métabolisé dans l'air expiré. Cette élimination se poursuit au moins 24 heures après l'exposition ; la mesure du benzène dans l'air expiré est préconisée comme indicateur d'exposition récente au benzène.

■ *La voie urinaire*

L'élimination urinaire du benzène non métabolisé représente moins de 1 % ; le benzène est surtout éliminé sous forme de phénols ; le dosage des phénols urinaires est l'un des moyens de contrôle de l'exposition professionnelle, complémentaire des contrôles d'atmosphère. On admet que la moitié du benzène inhalé est rejetée avec l'air expiré lors d'une exposition professionnelle. 30 à 40 % sont éliminés par voie rénale après oxydation en phénols. Une petite quantité reste fixée au niveau tissulaire.

1. Transformations métaboliques du benzène

Ces transformations sont réalisées en grande partie au niveau hépatique ; elles ont pour finalité de rendre le benzène plus hydrosoluble et de faciliter son élimination par voie rénale.
Une oxydation du benzène est réalisée dans un premier temps par les monooxygénases associées au cytochrome P-450 du réticulum endoplasmique ; elle aboutit à la formation d'un époxy benzène, intermédiaire électrophile, très réactif, très instable, qui pourra se fixer sur les macromolécules cellulaires ou conduire à la formation d'autres métabolites :

- *phénol*, par réarrangement spontané non enzymatique ;
- transdiol (trans 1,2-dihydro-1,2-dihydroxybenzène) par une époxyde hydrase, ce dérivé diol conduisant au *pyrocatechol* par déshydrogénation, puis à l'*acide muconique* (*fig. 1*) ;
- acide phényl mercapturique par conjugaison au glutathion, en présence de glutathion S-transférase. Les dérivés phénoliques peuvent être transformés ensuite en sulfo et glucurono conjugués, puis être éliminés par voie urinaire.

C'est la formation in situ de phénols qui serait responsable de la toxicité du benzène :

- les homologues supérieurs, toluène et xylènes, sont oxydés directement au niveau de leur chaîne latérale ; ils ne subissent qu'une hydroxylation très faible de leur noyau aromatique et ne présentent pas la toxicité hématopoïétique du benzène ;
- la toxicité médullaire spécifique du benzène s'expliquerait par les transformations métaboliques réalisées au niveau de la moelle osseuse. Phénol et diphénols formés subiraient l'action de monooxygénases, responsables de la formation

d'intermédiaires radicalaires (dérivés phénoxy, semiquinones...) extrêmement réactifs, capables de se combiner irréversiblement avec les protéines et acides nucléiques cellulaires. Cette oxydation serait favorisée par les concentrations élevées d'anions superoxydes présentes au niveau de la moelle osseuse, du fait de l'absence de superoxyde dismutase dans ce tissu. Au niveau hépatique en revanche, la concentration en superoxyde dismutase serait suffisamment importante pour assurer la destruction de l'anion superoxyde formé au cours du métabolisme, et inhiber ainsi les réactions radicalaires.

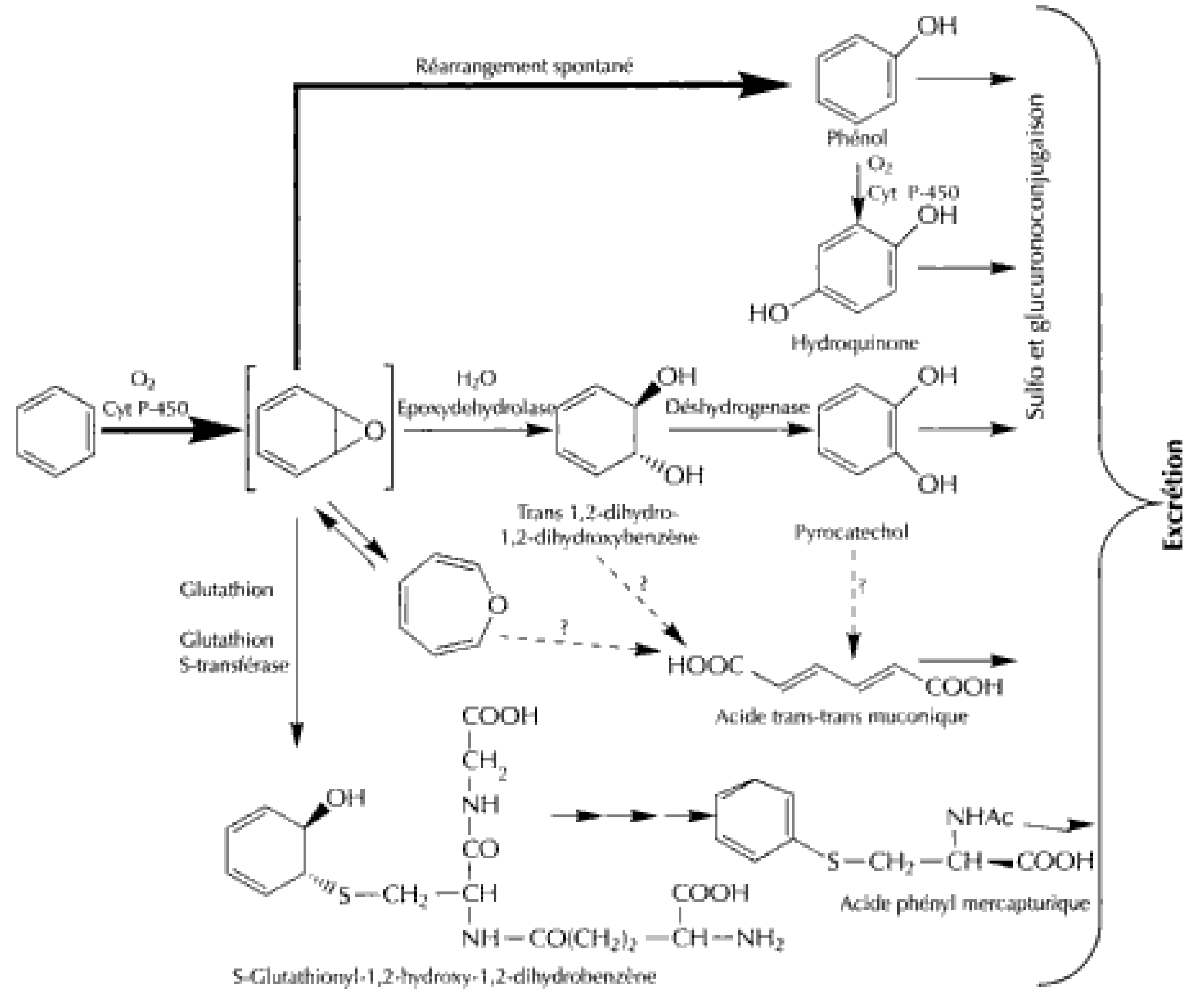


Figure 1a. Schéma des principales voies d'oxydation métabolique du benzène (Picot, 1979)

Liaisons covalentes avec les macromolécules cellulaires

Nécrose

Radical-anion semiquinonique

p-Quinone

Figure 1b. Mécanismes postulés de formation d'intermédiaires radicalaires du phénol et de l'hydroquinone

2. Mécanismes d'action toxique

a) Atteinte du système nerveux

Également retrouvée avec les homologues supérieurs du benzène, elle résulte de la lipophilie de ce solvant. Elle se traduit, à forte dose, par une action dépressive sur le système nerveux central, aboutissant à la narcose dans les intoxications aiguës.

b) Atteinte cutanée

Elle procède en partie de mécanismes identiques :
- action dissolvante des lipides cutanés protecteurs ;
- effet irritant et sensibilisant.

c) Atteinte des tissus hématopoïétiques

Elle est dominante avec pancytopénie et elle est spécifique de l'intoxication chronique par le benzène. Elle serait liée à la formation de métabolites, intermédiaires réactifs formés lors de l'oxydation en phénols et responsables d'effets de toxicité directe : aplasie médullaire, leucémie.

■ *Génotoxicité*
- *in vitro* : le benzène n'est pas mutagène sur bactéries (*Salmonella typhimurium his*⁻, TA 98 et TA 100) ; mais l'essai de mutation ponctuelle au locus HPRT sur cellules humaines ayant gardé leurs capacités métaboliques est positif ;
- *in vivo* :
  - formation de micronoyaux chez le rat et la souris, dose-dépendante ;
  - augmentation des échanges de chromatides-sœurs sur cultures de lymphocytes humains en présence de S9 mix ;
  - aberrations chromosomiques sur lymphocytes de populations exposées.

■ *Activité promotrice de tumeur*

■ *Activités enzymatiques*
- induction des monooxygénases cytochromes P-450 dépendantes qui participent au métabolisme du benzène ;
- diminution des phosphatases alcalines ;
- inhibition des peroxydases et catalases érythrocytaires ;
- inhibition de l'ALA synthétase.

■ *Effet immuno-suppresseur*
- baisse du taux de complément du sérum ;
- diminution de la production d'immuno-globulines IgA et IgG ;
- augmentation des IgM.

L'action toxique indirecte du benzène se traduit par :
- la spoliation soufrée qui s'explique par l'intensité des réactions de conjugaison lors de l'exposition au benzène ;
- la carence en vitamine C ;
- l'avitaminose B.

L'exposition répétée de rats au benzène induit non seulement des atteintes hématologiques, mais des cancers du foie, des glandes mammaires et des glandes de Zymbal : l'incidence des cancers oro-pharyngés est également élevée lorsque le solvant est administré *per os*.

Le benzène passe la barrière fœtoplacentaire : il est fœtotoxique, mais ne semble pas tératogène.

C. Symptomatologie de l'intoxication chez l'homme

1. Toxicité aiguë

Les intoxications aiguës sont rares et restent accidentelles. Par inhalation, elles peuvent survenir par rupture de containers ou de réacteurs et entraîner la mort après un séjour d'une dizaine de minutes dans une atmosphère à 20 000 ppm. L'action solvante du benzène provoque un état d'ivresse accompagné de congestion du visage et de vomissements. Selon la gravité de l'intoxication, on observera :
- simple ébriété ;
- somnolence pouvant aller jusqu'au coma ;
- convulsions à hautes doses ;
- coma qui peut être mortel par collapsus cardiaque.

L'intoxication aiguë par ingestion est marquée par les troubles digestifs, les troubles neurologiques identiques aux précédents et une pneumopathie d'inhalation (due à l'inondation des voies respiratoires par le benzène, et aggravée par les vomissements éventuels).

2. Toxicité chronique

Les troubles neuropsychiques sont classiques de l'intoxication par solvants (irritabilité, diminution des capacités de concentration, de mémorisation, syndrome dépressif, troubles du sommeil). Ils accompagnent les *effets hématopoïétiques* qui sont de loin les troubles les plus redoutables du benzolisme. Le seuil de toxicité du benzène serait de 10 ppm à 30 ppm selon les auteurs.

a) La phase initiale d'intoxication

Elle est marquée par la fatigue, les troubles digestifs, l'odeur spéciale de l'haleine et une légère polynucléose qui précède la *grande hémopathie benzolique* ; celle-ci se caractérise par :
- le syndrome hémorragique avec purpura, hémorragies profondes, épistaxis : c'est l'indice le plus précoce et le plus fréquent de l'intoxication avec :
  - signe du lacet positif,
  - thrombopénie : plaquettes pouvant descendre à 40 000/mm^3 ;
- le syndrome anémique : l'anémie est importante (2 *10^6 GR/mm^3 quelquefois moins) ;
- la leucopénie : le taux de leucocytes peut chuter à 2 000/mm^3 et même à 1 000/mm^3 ; la diminution porte surtout sur les polynucléaires neutrophiles (< 30 %) et est souvent accompagnée d'un syndrome nécrotique gingivobuccal. Une hyperleucocytose, parfois une polyglobulie peuvent être notées. Ces anomalies régressent à l'arrêt de l'exposition.

Lorsque l'intoxication se prolonge, ce qui est maintenant rare depuis l'application des mesures de prévention, ou lors d'une réexposition après une première intoxication, on peut observer les hémopathies malignes : l'atteinte des cellules hématopoïétiques pouvant revêtir divers aspects.

b) L'aplasie, médullaire

Son délai d'apparition est variable, de quelques mois à plusieurs dizaines d'années après le début de l'exposition. L'effet aplasiant peut débuter sur une lignée. On observe d'abord une thrombopénie et/ou leucopénie modérées. L'atteinte médullaire se généralise et atteint les trois lignées. Malgré les traitements, l'évolution est mortelle en 6 à 18 mois, marquée par des complications infectieuses ou hémorragiques (purpura). Dans un premier temps, le myélogramme peut être normal, et même riche : hyperplasie granuleuse, augmentation des éléments jeunes. En fin d'évolution, il devient très pauvre, voire désertique.

c) Les leucémies benzéniques

Cette fois encore, leur délai d'apparition est variable. Toutes les lignées peuvent être touchées mais les hémopathies les plus fréquentes sont des leucoses. La forme la plus souvent rapportée est la leucémie aiguë myéloblastique (LAM) mais des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou monoblastiques, des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) ou lymphoïdes (LLC), des proliférations de la lignée rouge, des thrombocytoses… ont également été décrites.

Le pouvoir leucémogène du benzène est attesté par de nombreuses études épidémiologiques ; il se manifesterait lors de l'exposition répétée à des concentrations de benzène de quelques ppm pendant plusieurs dizaines d'années. Ces atteintes survien-draient plus fréquemment après des expositions faibles et continues, plutôt qu'élevées et intermittentes. Une relation dose-effet a été mise en évidence entre l'incidence des leucémies et l'importance de l'exposition (ppm/mois). Cependant, il n'est pas possible de déterminer expérimentalement les doses de benzène ne produisant pas d'effet. Les extrapolations vers les faibles doses des relations doses-effets résultant des enquêtes épidémiologiques en milieu professionnel restent discutables.

Des aberrations chromosomiques sont observées dans les lymphocytes de sujets exposés au benzène. Les aberrations sont associées à une exposition de plusieurs années au solvant ou à l'existence de signes cliniques d'intoxication ; mais elles n'ont pas de valeur pronostique quant à la survenue d'un état pathologique.

Les études épidémiologiques ne permettent pas d'imputer au benzène d'effets sur la reproduction. Sa responsabilité dans la fréquence plus élevée des avortements chez les femmes exposées n'est pas prouvée, les polyexpositions étant souvent la règle en milieu professionnel.

La variabilité individuelle est très importante quant aux manifestations toxiques du benzolisme. Elle peut être mise en relation avec les nombreux facteurs qui influencent le métabolisme du benzène : âge, sexe, état hormonal, association à des inducteurs stimulant son métabolisme (médicaments, solvants, alcool, stéroïdes…).

D. Traitement

Le traitement des intoxications aiguës par inhalation est le traitement de l'asphyxie :

- soustraire l'intoxiqué de l'atmosphère contaminée ;
- augmenter l'épuration pulmonaire ;
- intuber et assurer une hyperventilation dans les cas graves ;
- proscrire les amines pressives (type adrénaline) qui peuvent favoriser l'apparition de la fibrillation et de la syncope cardiaque.

Dans le cas d'intoxication *per os*, faire en plus une aspiration gastrique, sous couvert d'une intubation avec sonde à ballonnet gonflable.
Le traitement de l'intoxication chronique est purement symptomatique ; la détoxication sera très lente. On traitera :
- les formes légères : par l'emploi des substances antianémiques, de corticoïdes, de vitamines C et K. Surveillance hématologique obligatoire ;
- l'aplasie médullaire : symptomatiquement avec transfusions de sang, de culots globulaires, leucocytaires et plaquettaires. Emploi de corticoïdes et couverture antibiotique. Ce traitement reste décevant ;
- les leucoses : de la même façon que les leucoses idiopathiques. Actuellement la prévention est essentielle, elle sera assurée par un dépistage précoce des intoxications et la surveillance des niveaux d'exposition.

E. Dépistage du benzolisme

1. Tests d'exposition

a) Diagnostique biologique

■ ***Dosage de l'acide muconique urinaire***

L'acide muconique, bien qu'étant un métabolite mineur du benzène, est spécifique d'une exposition à cet hydrocarbure. Le dosage de l'acide muconique urinaire permet de contrôler l'exposition de salariés exposés à de faibles concentrations atmosphériques de benzène, sans interférence majeure. La méthode élaborée par l'INRS par HPLC est maintenant largement utilisée en France comme à l'étranger et a été considérée par l'OMS comme technique de référence en 1996. Le modèle de corrélation entre concentrations atmosphériques de benzène et concentrations urinaires d'acide muconique, validé sur le terrain, a permis d'établir en 1993 un indice biologique d'exposition (IBE) de 5 mg/L d'acide muconique urinaire correspondant à une valeur moyenne d'exposition (VME) de 5 ppm de benzène (*tab. 1*).

■ ***Dosage des phénols urinaires***

Le dosage des phénols urinaires est une méthode ancienne qui manque de spécificité. L'excrétion urinaire des phénols est influencée par l'alimentation, les traitements médicamenteux, les infections intestinales… Du fait de l'abaissement régulier des valeurs-seuils atmosphériques, le phénol résultant de l'exposition au benzène diminue et devient difficilement discernable du bruit de fond lié aux phénols urinaires ayant d'autres origines. Le dosage est réalisé par CPG. Un taux de 50 mg/g de créatinine correspondrait à une exposition de 8 heures à 10 ppm, selon les indices biologiques d'exposition de l'ACGIH (« *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* ») aux États-Unis (*tab. 1*).

■ ***Dosage du benzène dans le sang et l'air expiré***

Le dosage du benzène dans le sang est un test peu facile à instaurer en routine. Le dosage du benzène dans l'air expiré en revanche est plus utilisé pour le contrôle de l'exposition professionnelle.

Tableau 1. Valeurs des indices biologiques d'exposition (IBE, BEI et BAT) adoptés par la France, l'ACGIH et la RFA. (Cahiers de notes documentaires, ND 2064-169-97, ND 2065-169-97)

Substance (CAS)	Paramètre	Milieu	IBE France			BEI ACGIH			BAT RFA	
				Prél. (1)	Note		Prél. (1)	Note		Note
Benzène (71-43-2)	Acide muconique	Urine	5 mg/L	A						
	Phénol total	Urine				50 mg/g de créatinine	A	Bf, Ns		
	Benzène	Air expiré – total – fin expiration				 0,08 ppm 0,12 ppm	 B B	 Sq Sq	*Voir tableau 2*	
	Acide S-phényl-mercapturique*	Urine				0,025 mg/g de créatinine	A			
Éthylbenzène (100-41-4)	Acide mandélique	Urine	1 500 mg/g de créatinine	D		1 500 mg/g de créatinine	D	Ns		
Styrène (100-42-5)	Styrène	Sang veineux	0,55 mg/L	A	Sq	0,55 mg/L	A	Sq		
			0,02 mg/L	L	Sq	0,02 mg/L	B	Sq		
	Acide mandélique	Urine	800 mg/g de créatinine	A	Ns	800 mg/g de créatinine	A	Ns	400 mg/g créatinine	b
			300 mg/g de créatinine	L	Ns	300 mg/g de créatinine	B	Ns		
	Acide phényl-glyoxylique	Urine	240 mg/g de créatinine	A	Ns	240 mg/g de créatinine	A	Ns		
			100 mg/g de créatinine	L		100 mg/g de créatinine	B			
	Acides mandélique + glyoxylique	Urine							500 mg/g de créatinine	b
Toluène (108-88-3)	Toluène	Sang veineux	1 mg/L	A	Sq	1 mg/l	A	Sq		
		Sang							1 mg/L	b
	Acide hippurique	Urine	2 500 mg/g de créatinine	A ou G	Bf Ns	2 500 mg/g de créatinine	A ou G	Bf Ns		
	o-Crésol	Urine							3 mg/L	b, c
Xylènes (1330-20-7) techniques	Xylène	Sang							1,5 mg/L	b
	Acides méthyl-hippuriques	Urine	1 500 mg/g de créatinine	A		1 500 mg/g de créatinine	A			
	Acides méthyl-hippuriques (ac. tolurique)	Urine							2 000 mg/L	b

(1) Modalités de prélèvement ; * Proposition d'ajout ; A : Fin de poste ; B : Avant le début du poste suivant ; D : Fin du poste, à la fin de la semaine de travail ; G : Quatre dernières heures du poste ; L : Avant le poste ; Bf : Bruit de fond chez les non-exposés ; Ns : Non spécifique (observé suite à l'exposition à d'autres substances) ; Sq : Semi-quantitatif (interprétation ambiguë) ; b : Fin de l'exposition ou fin de poste ; c : Pour les expositions à long terme : après plusieurs postes.

Les valeurs de ces indices biologiques d'exposition peuvent être corrélées avec les concentrations atmosphériques de benzène (*tab. 2*). Les corrélations entre les BEI (« *Biological Exposure Indices* »), selon l'ACGIH ou les BAT (« *Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte* ») établies en RFA et l'exposition par inhalation à des concentrations égales à la valeur limite pondérée (VME ou TLV-TWA aux USA) sont présentées dans le *tableau 1*.

Tableau 2. Corrélations entre la concentration atmosphérique de benzène sur le lieu de travail et sa concentration ou celle de ses métabolites dans les milieux biologiques prélevés en fin d'exposition ou en fin de poste établies en RFA (Cahiers de notes documentaires, ND 2064-169-97)

Concentration de benzène dans l'air		Benzène dans le sang total[a] µg/L	Acide S-phényl-mercapturique dans l'urine[a] mg/g créatinine	Acide trans-transmuconique dans l'urine[a] mg/L
mL/m3	mg/m^3			
0,3	1,0	0,9	0,010	[b]
0,6	2,0	2,4	0,025	1,6
0,9	3,0	4,4	0,040	
1,0	**3,3**	**5**	**0,045**	**2**
2,0	6,6	14	0,090	3
4,0	13	38	0,180	5
6,0	19,5		0,270	7

a. Prélèvement en fin d'exposition ou fin de poste.
b. Non déterminé.

■ *Dosage du benzène dans les solvants*

Ce dosage réalisé par chromatographie en phase gazeuse représente l'étape essentielle de la prévention technique. Il permet de contrôler que le taux de benzène dans les solvants de substitution, notamment ses homologues supérieurs comme le toluène et les xylènes, est inférieur à 0,1 % selon les prescriptions réglementaires (décret du 13 février 1986, modifié par décret du 6 septembre 1991).

■ *Dosage du benzène dans les atmosphères*

Le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse, après adsorption sur charbon actif et élution.

F. Prévention

1. Surveillance médicale du personnel exposé

a) Visite périodique des ouvriers (tous les 6 mois)

- examen clinique ;
- examen hématologique portant sur la numération globulaire, la formule leucocytaire, le temps de saignement, le signe du lacet.

b) Visites supplémentaires

Prévues en cas d'indisposition ou de symptômes rentrant dans le cadre de ceux du benzolisme, non seulement pour le sujet atteint, mais aussi pour tous les ouvriers travaillant dans le même local (visite tous les 2 mois jusqu'à l'arrêt des troubles).

c) Tenue d'un registre spécial

Les dates et durées d'absence pour maladies, ainsi que leurs causes y seront consignées.

2. Sélection des ouvriers à l'embauche

Sont déclarés inaptes :
- les sujets âgés de moins de 18 ans ;
- les femmes enceintes et les nourrices ;
- les sujets atteints antérieurement d'une hémopathie chronique ou présentant :
  - une formule sanguine anormale,
  - une numération globulaire trop faible,
  - un temps de saignement trop long.

3. Prévention individuelle

Elle est assurée par :
- l'information des sujets exposés sur les risques encourus, les précautions d'emploi et l'hygiène individuelle (douches, repas en dehors des locaux de travail) ;
- le port de vêtements protecteurs et le port de masques à cartouche si un risque subsiste.

4. Prévention collective

Elle consiste à :
- remplacer le benzène par un autre solvant dans tous les cas possibles ;
- si l'usage du benzène est indispensable, éviter son évaporation et travailler en vase clos ;
- contrôler la teneur en benzène des solvants de remplacement : cette teneur doit rester < 0,1 %, autrement ces liquides ne doivent être utilisés qu'en appareil clos ;
- effectuer une aspiration « *per descensum* » des locaux ou par des buses d'aspirations mobiles ;
- procéder à des dosages d'atmosphère fréquents (contrôle à hauteur des voies respiratoires du personnel) et à des contrôles de l'exposition individuelle par échantillonneur portatif.

G. Valeurs limites d'exposition

La valeur limite moyenne d'exposition au benzène adoptée actuellement en France pour le milieu professionnel est encore de 5 ppm soit 16 mg/m^3 *(tab. 3)*. Cette valeur sera abaissée à 1 ppm soit 3,25 mg/m^3 à compter du 27 juin 2000, conformément à la directive européenne 97/42/CE du 27 juin 1997 concernant la protection des travailleurs exposés au benzène. Cependant, à titre transitoire, jusqu'à

trois ans après la date indiquée, les états membres pourront retenir une valeur de 3 ppm.
Aux États-Unis, l'ACGIH a proposé d'abaisser la valeur limite moyenne de 10 ppm à une valeur de 0,3 ppm soit 0,96 mg/m^3 ; cette valeur était encore provisoire au 31 janvier 1999. En Allemagne, la valeur limite de 2,5 ppm soit 8 mg/m^3 a été adoptée pour les atmosphères de cokeries, des aires de ravitaillement dans l'industrie des essences minérales ou des ateliers de révision et de réparation des équipements de transport de l'essence ou du benzène. La valeur limite est de 1 ppm soit 3,2 mg/m^3 pour les autres types d'opération.

Tableau 3. Valeurs limites d'exposition professionnelle en ppm et en mg/m^3 d'air (INRS, 1996)

	VLE Exposition sur moins de 15 minutes		VME Moyenne d'exposition sur 8 heures	
	ppm	mg/m^3	ppm	mg/m^3
Benzène			5 1*	16 3,25*
Cumène			50	245
Éthylbenzène			100	435
Styrène			50	215
Toluène	150	550	100	375
Xylènes	150	650	100	435

*Prescription à compter du 27 juin 2000 (Directive Européenne 97/42/CE).

La population générale est exposée au benzène présent dans la pollution de fond urbaine liée à la circulation automobile (gaz d'échappement et émissions des réservoirs d'essence) et aux autres modes de combustion incomplète (foyers domestiques). Les valeurs-seuils proposées actuellement pour les réseaux de surveillance de la pollution atmosphérique par l'Union européenne ou par le Conseil supérieur d'hygiène publique en France sont de l'ordre de 0,003 ppm, soit 10 µg/m^3 d'air. Ces valeurs sont respectées en moyennes annuelles dans les grandes agglomérations.

H. Conclusion

Malgré sa grande toxicité et une réglementation sévère, le benzène reste encore un solvant couramment employé non seulement en industrie chimique, mais aussi dans les laboratoires de recherche et d'analyse. Dans ces deux derniers secteurs, la surveillance est moins bien réglementée de sorte que les mesures de prévention doivent être draconiennes. Si l'étude des statistiques des maladies professionnelles en France montre une diminution d'un facteur trois du nombre de déclarations d'atteintes sanguines (passées de 76 à 26 entre 1978 et 1995), et d'un facteur deux des leucémies (passées de 27 à 14 entre 1984 et 1995), le benzolisme est loin d'être une maladie disparue. Aussi n'attirera-t-on jamais assez l'attention des utilisateurs sur les risques présentés par le benzène ou par les solvants qui en renferment et sur les précautions à prendre lors de sa manipulation.

II. Homologues supérieurs du benzène

Les principaux homologues supérieurs du benzène sont le toluène, les xylènes, l'éthylbenzène, le cumène, le styrène et les dérivés triméthylés du benzène (*fig. 2*). Ils présentent des caractères solvants qui permettent de les substituer au benzène dans la plupart de ses usages ; leur moindre volatilité les rend moins dangereux, mais ils présentent une toxicité aiguë sur le système nerveux aussi forte sinon plus forte que celle du benzène.
Leur métabolisation, différente de celle du benzène, explique l'absence d'activité myélotoxique et d'effets hématologiques caractéristiques du benzénisme.

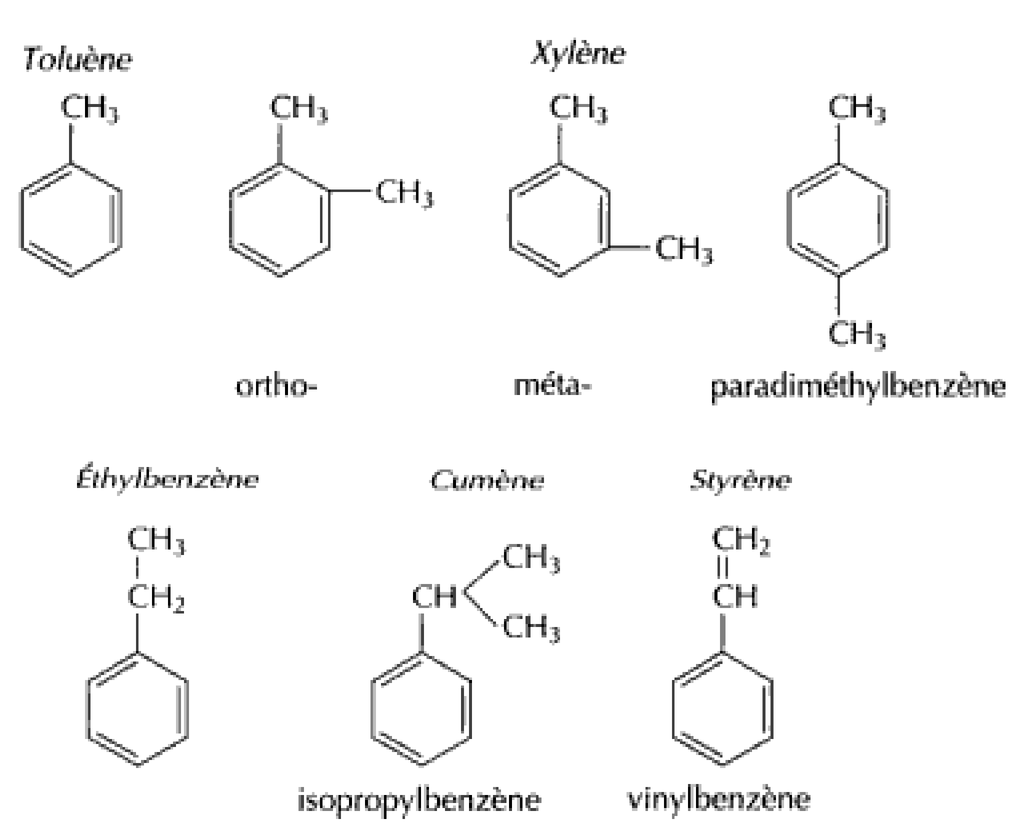


Figure 2. Structure des homologues supérieurs du benzène

A. Utilisation

Les homologues supérieurs du benzène sont des solvants des graisses, du caoutchouc, des vernis, peintures et laques, largement employés dans l'industrie du caoutchouc, des matières plastiques, des résines synthétiques et dans l'industrie chimique (fabrications d'insecticides, d'explosifs…). Le cumène est très utilisé comme constituant des essences d'avion à haut degré d'octane. L'éthylbenzène et le styrène sont surtout employés dans l'industrie du caoutchouc et des matières plastiques.

B. Métabolisme

Le plus souvent ces hydrocarbures sont absorbés par voie pulmonaire. La pénétration percutanée peut n'être pas négligeable.

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques des principaux hydrocarbures benzéniques

	Benzène	Toluène	Xylènes	Styrène
Masse moléculaire	78	92	106	104
Point d'ébullition	80 °C	110 °C	140 °C	145 °C
Densité Ds	0,879	0,867	0,86	0,90
Tension de vapeur en mm de mercure	100 à 26 °C	40 à 32 °C	10 à 28 °C	8,2 à 30 °C
Densité de vapeur (air = 1)	2,7	3,14	3,7	3,6

Les dérivés les plus légers sont éliminés en quantité importante par voie pulmonaire (20 à 50 % pour le toluène), le reste est métabolisé et excrété par voie urinaire. L'élimination pulmonaire est nettement plus faible pour les homologues moins volatils (2 et 5 % pour le styrène). Ces dérivés sont oxydés par le système des monooxygénases à cytochrome P-450 du réticulum endoplasmique, au niveau hépatique essentiellement. L'oxydation concerne la chaîne latérale attachée au noyau aromatique. L'oxydation en phénols est très secondaire sinon minime, contrairement au métabolisme du benzène.

1. Le toluène

Il est transformé en acide benzoïque, éliminé après conjugaison au glycocolle sous forme d'acide hippurique (75 %) ou à l'acide glucuronique (10-15 %). L'oxydation en crésol est inférieure à 1 %.

2. Les xylènes

Ils sont métabolisés sous forme d'acides méthylhippuriques (acides toluriques). Un faible pourcentage (2 à 4 %) subit une oxydation du noyau aromatique avec formation de xylénols.

3. L'éthylbenzène

Il est éliminé sous forme d'acide hippurique, d'acide mandélique et d'acide phénylacétique conjugué au glycocolle.

4. Le cumène

Il est oxydé sur le carbone 1 ou carbone 2 de la chaîne isopropyl ; les alcools formés peuvent être éliminés directement sous forme de glucuronoconjugé ou être oxydés en acide avant d'être conjugués.

5. Le styrène

Il est métabolisé en phénylglycol, qui peut conduire par oxydation à l'acide phénylglyoxylique ou au phényléthanol puis à l'acide benzoïque éliminé sous forme d'acide hippurique (40 %). L'oxydation de la chaîne vinyl passe par la formation d'un intermédiaire époxyde, dont la réactivité peut expliquer l'activité mutagène et cancérogène du styrène observée expérimentalement.

C. Toxicité

La lipophilie de ces hydrocarbures leur confère des propriétés toxiques communes à tous les solvants organiques :

- ce sont des irritants des muqueuses cutanées, oculaires et respiratoires en raison de leur pouvoir délipidant ; ce caractère est plus marqué encore pour les homologues de masse moléculaire élevée (éthylbenzène, cumène, styrène) ;
- ils sont dépresseurs du système nerveux central, avec une action ébrionarcotique qui les fait rechercher par les toxicomanes. Les symptômes de l'intoxication aiguë sont identiques à ceux observés avec le benzène.

L'inhalation de fortes concentrations de vapeurs d'hydrocarbures est responsable d'une irritation des muqueuses respiratoires, de troubles de conscience et peut provoquer des troubles de l'excitabilité cardiaque.

L'intoxication chronique s'accompagne de :

- dermatoses, fatigue, nervosité ;
- irritations nasale et bronchique ;
- céphalées, asthénies.

Des atteintes hépatique et rénale ont été décrites chez les toxicomanes inhalant du toluène et des xylènes.

En fait, le véritable danger de l'exposition à ces solvants sous forme de produits commerciaux dépend de leur teneur en benzène qui pourra donner lieu aux troubles hématologiques du benzolisme. Ces solvants traversent la barrière placentaire et sont comme le benzène, fœtotoxiques mais non tératogènes.

Il n'est pas possible de conclure quant au caractère cancérogène du styrène malgré :

- les aberrations chromosomiques significativement plus élevées trouvées chez des individus exposés à ce solvant ;
- les quelques cas de leucémies rapportés chez des ouvriers exposés au styrène. Les atteintes hématologiques (anémie, thrombopénie, leucopénie) décrites chez les personnes exposées au styrène sont contestées en raison de l'exposition concomitante de ces sujets à d'autres substances toxiques (benzène en particulier).

Le styrène serait responsable d'atteintes neurologiques périphériques et de névrites optiques.

Son potentiel tératogène n'est pas démontré, malgré des anomalies du système nerveux central signalées chez des enfants de mères exposées à ce produit.

D. Tests d'exposition

1. Dosage dans les milieux biologiques

L'importance de l'exposition sera évaluée par le dosage des métabolites urinaires et la teneur en solvant dans l'air expiré, voire dans le sang (*tab. 1*).

2. Dosage dans l'atmosphère

Par chromatographie en phase gazeuse, comme pour le benzène.

E. Prévention

Le contenu autorisé en benzène des solvants tels que toluène, xylènes et autres solvants (white-spirit…) doit être inférieur à 0,1 % (selon le décret du 13 février 1986, modifié par décret du 6 septembre 1991). En pratique, ces solvants peuvent être considérés comme exempts de benzène.
Au cas où la teneur en benzène serait supérieure, les opérations en vase clos ou dans des conditions extrêmement contrôlées s'imposent.
Les règles de prévention sont par ailleurs identiques à celles décrites à propos du benzène, pour ce qui concerne :

- la sélection des ouvriers à l'embauche à un poste d'exposition au toluène et aux xylènes ;
- la prévention individuelle et collective.

F. Valeurs limites d'exposition

Les valeurs limites moyennes d'exposition (VME) et les valeurs limites d'exposition de courte durée aux principaux homologues supérieurs du benzène sont notées dans le *tableau 3*.

Pour en savoir plus

- Bergeret A, Tolot F. 1984, *Benzène et benzolisme* Encyclopédie médico-chirurgicale. 16046 B10 5.
- Bismuth C. *Toxicologie clinique.* Éd Médecine Sciences Flammarion, Paris 1987.
- Cahier de notes documentaires. INRS, ND 1708-133-88, ND 1709-133-88, ND 1719- 134-89, ND 1945-153-93, ND 2064-169-97, ND 2065-169-97.
- De Bruin A. *Biochemical toxicology of environmental agents.* Elsevier 1976.
- Desoille H, Scherrer J et Truhaut R. Benzol. *Précis de médecine du travail.* Masson, Paris 1980 : 462-472.
- *Ducos P, Gaudin R, Bel J, Maire C, Francin JM, Robert A, et al. Trans, trans-muconic acid, a reliable indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level. Arch Occup Environ Health 1992 ; 64 : 309-313.*
- Fawell JK, Hunt S. *Environmental toxicology : organic pollutants.* Ed. Ellis Horwoos limited. Chichester England 1988.
- Haguenoer J, Frimat P, Bonneterre J et Vennin Ph. *Les cancers professionnels. Technique et documentation.* Lavoisier. Paris 1982. IARC Monographs supplement 6, 7 1987.
- INRS. *Benzène. Fiche toxicologique* n° 49 1992 ; pages 1-6.
- INRS. *Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France.* 1996. Mise à jour 1996, ND 1945-153-93.
- Lauwerys R. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles.* Ed Masson. Paris 1990.
- Normand JC, Bergeret A, Prost G. Benzène. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Toxicologie Pathologie professionnelle*, 16-046-B-10. Éditions scientifiques et médicales Elsevier. Paris 1997 ; 7 pages.
- Picot A. *Aspects biochimiques de la toxicité de substances chimiques.* 1979.
- INRS http://www.inrs.fr/actualités/benzene.


Hidden page

Hydrocarbures aliphatiques chlorés (solvants chlorés)

J. BELEGAUD, Laboratoire de Toxicologie, Université de Picardie, Faculté de pharmacie, Amiens.
J.-Y. LE TALAER, Département de Biochimie-Toxicologie, UFR de Pharmacie, Caen (révision 2007).

Ils résultent de la substitution d'un ou plusieurs atomes d'hydrogène par des atomes de chlore dans la formule des hydrocarbures aliphatiques à chaîne ouverte saturée ou non. Ils représentent une très importante famille de produits chimiques industriels dont l'essor économique est considérable depuis les restrictions d'emploi prises à l'encontre de certains hydrocarbures aromatiques (benzène, styrène).

I. Caractéristiques physico-chimiques

Ce sont des dérivés gazeux ou liquides possédant des propriétés physico-chimiques recherchées lors de diverses activités industrielles.

- l'ininflammabilité : ce caractère se développe en fonction de l'augmentation du nombre d'atomes d'halogène ;
- l'inertie chimique : elle permet un contact direct de différents substrats (métalliques, organiques, d'origine végétale) avec le solvant sans altération ;
- la volatilité : elle décroît avec le nombre d'atomes de carbone contribuant à accroître la densité du solvant dont les vapeurs seront en général plus lourdes que l'air ;
- la liposolubilité : elle contribue à l'efficacité technique recherchée du solvant ;
- l'adsorption sur charbon actif : elle sera mise à profil dans la protection individuelle (masque respiratoire) et le contrôle des atmosphères (captation).

La plupart des solvants chlorés présentent une certaine instabilité. Pour cette raison, il est nécessaire de leur adjoindre certains stabilisants (éthanol, phénol, amines…) parfois responsables d'une toxicité indirecte. Ils peuvent être également dégradés soit au contact de certains métaux (particulièrement l'aluminium), soit par la chaleur, soit par la lumière et dégager ainsi des produits de décomposition comme le chlore (Cl_2), l'acide chlorhydrique (HCl) et le phosgène ($COCl_2$) ou le dichlorure d'acétylène (ClC=CCl).

II. Principales utilisations

Le champ d'application est vaste et peut être plus ou moins spécifique d'un solvant particulier :

- décapage des peintures et vernis ;
- dégraissage et nettoyage de pièces métalliques ;
- extraction des huiles, graisses, colorants et parfums ;
- diluant et solvant dans l'industrie des peintures et vernis ;
- synthèse organique, agent de méthylation ;
- solvant et agent de purification dans l'industrie des matières plastiques, du caoutchouc ;
- nettoyage à sec, détachant dans les teintureries industrielles.

Une utilisation détournée est recherchée par certains jeunes toxicomanes qui peuvent inhaler les vapeurs de trichloréthylène pour la phase d'ivresse qu'elles procurent.

III. Biocinétique

A. Voies de pénétration

Elles sont conditionnées par leur volatilité et leur forte liposolubilité.

1. Voie respiratoire

Les dérivés ayant un rapport de solubilité sang/phase gazeuse élevé (chloroforme) se fixent fortement sur le sang à chaque inspiration, l'équilibre entre les deux phases étant beaucoup plus long à atteindre dans cette hypothèse.

2. Voie cutanée

Un simple contact peut entraîner des effets locaux. En cas d'exposition répétée, un passage systémique peut être envisagé.

B. Distribution

Leur grande liposolubilité assure une importante fixation sur l'hématie ainsi que sur les organes riches en lipides ou très vascularisés (SNC, tissu adipeux, glandes endocrines, muscles...). Pour la même raison, un passage fœto-placentaire élevé est observé.

C. Métabolisme

Il est dans la majorité des cas à l'origine de la toxicité par la production de métabolites intermédiaires toxiques. Il est étroitement dépendant de l'espèce considérée ce qui explique certaines discordances observées entre l'expérimentation animale et l'exposition humaine :

- la déhalogénation par réduction constitue l'une des principales voies pour les dérivés saturés. La réaction, sous la dépendance du cytochrome P-450 (CYP 2E1), produit dans un premier temps un métabolite intermédiaire possédant un électron célibataire fortement réactif.

$$CCl_4 \xrightarrow[e^-]{P450} {}^{\cdot}CCl_3 + Cl^-$$

Figure 1. Formation du radical trichloromethyl à partir du tétrachlorure de carbone

- la déhalogénation par oxydation s'appliquant également aux dérivés saturés, après conjugaison avec le glutathion (GSH), peut conduire à la formation de dérivés aldéhydiques réactifs étant ensuite soit oxydés en un acide carboxylique correspondant, soit réduit en un alcool primaire.

$$CH_2Cl_2 \xrightarrow[Cl^-]{GS^-} ClCH_2SG \xrightarrow[Cl^-]{OH^-} HOCH_2SG \longrightarrow HCHO + GSH$$

Figure 2. Formation de formaldéhyde à partir du dichlorométhane après conjugaison avec le glutathion (chloromethylglutathion)

- l'époxydation sous la dépendance du cytochrome P-450 (CYP 2E1), s'observe essentiellement avec les dérivés insaturés produisant également un intermédiaire à grande réactivité.

$$H_2C{=}CHCl \longrightarrow \text{H}_2\text{C}{-}\text{CHCl (époxyde, pont O)}$$

Figure 3. Formation d'un intermédiaire époxydé à partir du chlorure de vinyle

D. Élimination

Selon leur degré de volatilité et de liposolubilité, les plus volatils s'élimineront de manière inchangée par l'air expiré chaque fois que la pression partielle sanguine sera supérieure à celle de l'air alvéolaire.
Dans d'autres cas, la fraction d'hydrocarbure retenue dans l'organisme subira des biotransformations conduisant à la formation de métabolites polaires de phase II, facilement éliminés par voie urinaire.

IV. Mécanisme d'action toxique

Les métabolites intermédiaires de phase I sont à l'origine de la toxicité des solvants chlorés, chaque représentant pouvant avoir son propre mécanisme qui dépend en grande partie du niveau d'exposition.
La transformation métabolique du CCl_4 peut conduire à la formation de plusieurs métabolites intermédiaires réactifs :
- le radical trichloromethyl ($^\bullet CCl_3$) déjà évoqué précédemment ;
- le radical trichloromethylperoxyde ($Cl_3COO^\bullet$) ;
- le radical dichlorocarbène ($:CCl_2$).

Ces différents radicaux fortement réactifs peuvent initier une réaction de lipoperoxydation responsable d'attaques membranaires avec développement ultérieur d'apoptose et de proliférations cellulaires évoluant souvent en nécrose tissulaire selon l'importance de l'exposition.
Les *dérivés époxydés*, formés à partir de composés insaturés, fortement instables et électrophiles, pourront se fixer par liaison de covalence sur des cibles nucléophiles représentées par les protéines et les ADN, formant ainsi des adduits pouvant dans certains cas initier des processus de cancérogenèse (chlorure de vinyle).
Le *trichlorométhanol* (CCl_3OH) instable, formé à partir du trichlorométhane ($CHCl_3$), libère sous l'influence du cytochrome P-450, de l'acide chlorhydrique (HCl) et du phosgène ($COCl_2$).

Certains de ces intermédiaires hautement réactifs peuvent se conjuguer avec le glutathion (GSH), induisant ainsi un mécanisme de toxicité indirecte par déplétion.

V. Toxicité

A. Aiguë

Elle peut s'observer très rarement suite à des expositions massives liées à des accidents d'exposition professionnelle ou d'ingestions accidentelles de solvant contenu à tort dans un flaconnage alimentaire. Des cas de toxicomanie sont également rapportés, après inhalation volontaire de vapeurs de trichloréthylène et de chloroforme (« *sniffing syndrome* »).
La symptomatologie repose essentiellement sur la liposolubilité du composé.

1. Système nerveux central

Une phase d'ébriété (recherchée par certains toxicomanes) précède une phase dépressive induisant une narcose plus ou moins profonde. Avec certains composés, une véritable anesthésie peut s'observer (chlorure de méthyle, chloroforme, trichloréthylène…).

2. Myocarde

Des troubles de l'excitabilité myocardique (troubles du rythme, extrasystoles) peuvent être souvent associés, contre-indiquant formellement la moindre administration d'adrénaline qui déclencherait une fibrillation ventriculaire dramatique.

3. Tissu cutané

En cas de contact cutané ou oculaire, de fortes réactions d'irritation peuvent se manifester.

B. Chronique

Elle dépend étroitement du type de solvant envisagé et de son métabolisme. Un certain nombre de tissus et organes peuvent être atteints.

1. Tissu cutané

En cas d'exposition répétée, les dermatoses chroniques récidivantes, pouvant parfois évoluer en eczéma, représentent la manifestation la plus fréquente.

2. Système nerveux central périphérique

Des pertes de réflexes, des paralysies, des troubles de mémoire et du comportement sont souvent observés. Des rares cas de polynévrites sont rapportés pour certains solvants.

3. Foie

La formation de certains intermédiaires réactifs peut contribuer à des atteintes hépatiques plus ou moins sévères limitées soit à une libération des principaux marqueurs biochimiques, soit à une atteinte tissulaire (cytolyse).

4. Potentialités cancérogènes

Pour certains composés, un potentiel génotoxique a pu être mis en évidence sur des tests soit *in vitro*, soit *in vivo*. Chez l'animal, une incidence accrue de tumeurs peut être observée résultant de mécanismes génotoxiques ou épigénétiques. Chez l'homme, seul le chlorure de vinyle est reconnu cancérogène.

VI. Traitement des intoxications

Il n'est pratiqué qu'en cas d'intoxications aiguës. Seul un traitement symptomatique doit être appliqué :

- sortir l'intoxiqué de l'atmosphère contaminée. Éliminer les vêtements souillés et laver la peau à l'eau savonneuse ;
- en cas d'ingestion, pratiquer un lavage gastrique avec du charbon activé ;
- pratiquer une oxygénothérapie pour faciliter l'épuration pulmonaire du solvant ;
- traiter les troubles métaboliques si nécessaire avec des protecteurs hépatiques (méthionine, N-acétylcystéine) ;
- recourir à l'hémodialyse en cas d'altération de la fonction rénale ;
- réduire les troubles cardiaques par l'administration de propranolol.

Les amines biogènes (adrénaline, dopamine) sont formellement contre-indiquées dans toutes les intoxications par les solvants chlorés.

VII. Méthodes de dosage et mesures préventives

Des déterminations analytiques peuvent être pratiquées soit pour des contrôles d'atmosphères en milieu industriel, soit pour analyser des mélanges de solvants, soit pour doser les marqueurs biologiques comme témoins d'exposition.

A. Contrôle d'atmosphère/analyse de solvants

Une captation des vapeurs sur cartouches de charbon actif est réalisée sur le lieu de travail. Un dosage spécifique est ensuite pratiqué au laboratoire après élution de la cartouche.
Les méthodes physiques utilisables reposent sur la chromatographie gaz/liquide équipée d'un détecteur à capture d'électrons (spécifique de la présence d'halogènes). La spectrophotométrie UV ou infrarouge permet d'obtenir des spectres spé-

cifiques utilisés pour des dosages. La recherche ou la détection de fuite peut se faire par la réaction de Beilstein au cours de laquelle un solvant chloré au contact d'une flamme est pyrolysé en libérant des halogénures qui, au contact de cuivre, forment un halogénure cuivreux émettant dans la flamme un spectre caractéristique bleu lilas (lampe à halogène).
Une méthode chimique, reposant sur la réaction alcalino-pyridinique de Fujiwara, permet également des dosages colorimétriques.

Tableau 1. 12e tableau des maladies professionnelles (régime général) concernant un grand nombre de dérivés halogénés des hydrocarbures aliphatiques

Désignation des maladies	Délai de prise en charge	Liste indicative des principaux travaux susceptibles de provoquer ces maladies
Troubles neurologiques aigus :		Préparation, emploi et manipulation des produits précipités (ou des préparations en contenant), notamment comme solvants ou matières premières dans l'industrie chimique, ainsi que dans les travaux ci-après : extraction des substances naturelles, décapage, dégraissage des pièces métalliques, des os, peaux et cuirs et nettoyage des vêtements et tissus.
Syndrome ébrieux pouvant aller jusqu'à des manifestations psychiques délirantes ;	7 jours	
Syndrome narcotique pouvant aller jusqu'au coma avec ou sans convulsions ;	7 jours	
Névrite optique ;	7 jours	
Névrite trigéminales.	7 jours	Préparation et application des peintures et vernis, des dissolutions et enduits de caoutchouc.
Troubles neurologiques chroniques :		
Syndrome associant troubles de l'équilibre, de la vigilance, de la mémoire.	90 jours	Fabrication de polymères de synthèse [chloro-2-butadiène-1,3, dichloro-1-1-éhylène (dichororéthylène asymétrique)].
Troubles cutanéo-muqueux aigus :		
Dermo-épidermite chronique irritative ou eczématiforme récidivant après nouvelle exposition au risque ;	7 jours	Préparation et emploi du dibromo-1-2-éthane, en particulier dans la préparation des carburants.
Conjonctivite chronique.	90 jours	
Troubles hépato-rénaux :		
Hépatite cytolytique, ictérique ou non, initialement apyrétique ;	7 jours	
Insuffisance rénale aiguë.	7 jours	
Troubles cardio-respiratoires :		
Œdème pulmonaire ;	7 jours	
Troubles du rythme ventriculaire cardiaque avec possibilité de collapsus cardiovasculaire.	7 jours	
Troubles digestifs :		
Syndrome cholériforme apyrétique.	7 jours	

B. Marqueurs biologiques

Le dosage dans le sang est d'une pratique assez délicate en raison d'une forte liposolubilité nécessitant la mise en œuvre de techniques d'isolement spécifiques. La technique du « *head space* » peut être utilisée pour les solvants présentant une bonne volatilité.
Le recours au dosage des métabolites urinaires permet, en général, une bonne évaluation du degré d'exposition d'un sujet. Il est d'usage d'exprimer les résultats en unités de gramme (mg ou µg) rapportées au taux de créatinine urinaire afin de corriger l'effet de diurèse.
Il est également possible de pratiquer des dosages du solvant dans l'air expiré, notamment pour ceux faiblement métabolisés. Le prélèvement doit être effectué dans des sacs en matière plastique surchlorée (Saran ou Tedlar), étanches aux gaz.

C. Mesures préventives

Un suivi médical doit être respecté dans le cadre de la médecine du travail. La protection peut être assurée par la mise en œuvre de ventilation adaptée des locaux, par des dispositifs de protection individuelle (masques à charbon actif, gants, lunettes, vêtements) par le respect des valeurs limites admissibles dans l'atmosphère et par une bonne connaissance de l'étiquetage des récipients.
L'exposition à la plupart de ces solvants entre dans le cadre de la réparation au titre des maladies professionnelles soit du régime général, soit du régime agricole. L'évaluation des principaux marqueurs biologiques peut être demandée périodiquement.

VIII. Principaux solvants chlorés

Le nombre de composés étant très élevé, seuls seront traités ceux ayant une certaine importance industrielle ou ceux marqués par une forme de toxicité particulière.

- VME : valeur moyenne d'exposition en milieu industriel ;
- VLE : valeur limite d'exposition en milieu industriel ;
- IARC : agence internationale de recherches sur le cancer :
  - liste I : cancérogène chez l'homme,
  - liste 2A : probablement cancérogène chez l'homme,
  - liste 2B : possibilité de cancer chez l'homme,
  - liste 3 : ne peut être considéré comme cancérogène chez l'homme.

A. Chlorure de méthyle (CH_3Cl)

Il est encore utilisé en milieu industriel pour ses propriétés méthylantes.
À température ordinaire, c'est un gaz incolore et inodore.

1. Métabolisme

Fortement volatil, il est rapidement métabolisé dans l'organisme en *formaldéhyde* (HCHO) et *acide formique*. (HCOOH). La formation de méthane-thiol (CH_3SH) a également été démontrée chez l'animal.

2. Toxicité

D'importantes déplétions en GSH ont été mises en évidence. Une nécrose hépatocytaire ainsi qu'une insuffisance rénale oligurique sont uniquement observées en cas d'exposition aiguë. Des accumulations graisseuses modérées sont rapportées au niveau du foie lors d'expositions répétées. Des effets sur la contractibilité myocardique sont parfois observés.
Il possède un pouvoir mutagène marqué sur les tests *in vitro*.
À fortes doses, une incidence accrue de tumeurs rénales (adénocarcinomes papillaires) a été observée chez la souris mâle. Sur différents tissus (foie, reins, poumons), une alkylation directe de l'ADN n'a pu être démontrée à la différence des autres dérivés halogénés méthylés examinés (bromure et iodure de méthyle).
= classé liste 3 (IARC).

B. Dichlorométhane (CH_2Cl_2)

Encore appelé chlorure de méthylène, ce solvant bénéficie d'une très large utilisation en milieu industriel essentiellement pour ses propriétés dissolvantes et extractives. Il est également utilisé dans la fabrication de matières plastiques.
C'est un liquide incolore, très volatil, nécessitant la présence de stabilisants (phénol, amines...). L'aluminium, le magnésium et le cuivre sont sensibles à son action. Il se décompose assez facilement à la chaleur en phosgène.

1. Métabolisme

Il est métabolisé dans l'organisme de tout mammifère en un intermédiaire aldéhydique (déjà envisagé précédemment) puis en *monoxyde de carbone* (CO), une partie se fixant sur l'hémoglobine (carboxyhémoglobine), l'autre étant éliminée par l'air expiré.

2. Toxicité

Pour de fortes expositions, il exerce un effet dépresseur très marqué sur le SNC ainsi que des propriétés arythmogènes.
Des réponses génotoxiques positives ont été démontrées *in vitro* alors que les tests *in vivo* s'avèrent négatifs. Des études de cancérogenèse ont mis en évidence l'apparition significative de tumeurs (carcinomes du foie et des poumons) chez la souris mais pas chez le rat.
= classé liste 2B (IARC) VME : 50 ppm.

C. Trichlorométhane ($CHCl_3$)

Plus connu sous le nom de chloroforme, ses utilisations tendent progressivement à se limiter au domaine de la synthèse organique. L'évolution des connaissances sur sa toxicité a conduit en 1996 à supprimer son utilisation dans la composition de certaines spécialités pharmaceutiques (solutions buvables à visée cholérétique) et à fortement limiter sa présence en tant que solvant résiduel dans les principes actifs médicamenteux.
C'est un liquide incolore, stabilisé par addition d'antioxydant (0,5 % à 1 % d'éthanol) pour éviter sa dégradation photochimique.

1. Métabolisme



Figure 4. Métabolisme du trichlorométhane

2. Toxicité

Il possède des propriétés fortement anesthésiques avec un risque important d'hyperexcitabilité myocardique. Par la formation de métabolites réactifs, deux organes cibles se dégagent principalement chez l'animal :
foie : hépatite cytolytique centrolobulaire observée chez le rat des deux sexes, résultant d'une forte déplétion en GSH par la formation de diglutathionyl dithiocarbonate ;
rein : présence de nécrose tubulaire observée spécifiquement chez la souris mâle.
L'absence de propriétés tératogènes a été démontrée chez le rat et le lapin.
Malgré une absence de génotoxicité, des tumeurs hépatiques et rénales ont été mises en évidence pour de fortes concentrations par voie orale chez la souris mâle et des tumeurs rénales chez le rat recevant le solvant par l'eau de boisson.
= classé en liste 2B (IARC) VME : 5 ppm.

D. Tétrachlorure de carbone (CCl_4)

En raison de la très haute toxicité de ce composé, ses utilisations sont très restreintes, limitées à la synthèse organique mettant à profit la grande réactivité de ses chlores.
C'est un liquide incolore, ininflammable, d'odeur caractéristique.

1. Toxicité

En cas d'exposition aiguë accidentelle, après la survenue rapide de troubles nerveux (conscience), deux organes cibles se manifestent après 24 à 48 heures :
- rein : une tubulopathie aiguë évoluant rapidement en anurie ;
- foie : une atteinte hépatocellulaire en marge de la toxicité rénale, se manifestant par la survenue d'une nécrose marquée par une élévation des principaux marqueurs biologiques (aminotransférases et lactate déshydrogénase) traduisant au niveau plasmatique l'atteinte de l'hépatocyte. La survenue de troubles du rythme cardiaque est également signalée.

L'intoxication chronique est à l'origine d'une symptomatologie digestive évolutive dont la stéatose hépatique, et éventuellement la cirrhose, constituent le terme. Comme avec la plupart des hydrocarbures aliphatiques halogénés, des atteintes cutanées sont possibles (dermatites récidivantes) mais rares en raison du respect des mesures préventives définies.
Les études animales n'indiquent pas de manifestations tératogènes.
Le potentiel génotoxique du CCl_4 a été montré sur divers tests. Une réponse négative s'observe avec le test d'AMES et avec les tests *in vivo* (micronucleus) alors que des réactions contradictoires sont rapportées sur des tests *in vitro* (aberrations chromosomiques, élution alcaline…).

Chez l'animal, des études de cancérogenèse ont montré une incidence accrue de carcinomes hépatocellulaires chez la souris, le rat et le hamster.
= classé en liste 2B (IARC) VME : 2 ppm.

E. Dichloroéthane ($CH_2Cl—CH_2Cl$)

Le dichlorure d'éthylène existe sous forme de deux isomères, le 1-2 dichloroéthane étant pratiquement le seul utilisé pour ses propriétés solvantes de matières plastiques et de résines. Pour peu de temps encore, il constitue l'un des additifs de l'essence plombée.
C'est un liquide incolore, ininflammable, d'odeur proche du chloroforme. L'allongement de la chaîne aliphatique accroît la liposolubilité de ce composé tout en abaissant sa volatilité. Il est habituellement stabilisé par des alkylamines.

1. Métabolisme

Le *chloroacétaldéhyde* ($ClCH_2CHO$) constitue un métabolite intermédiaire se dégradant ensuite en *acide chloroacétique* ($ClCH_2COOH$).

2. Toxicité

Son inhalation induit une forte dépression du SNC. Des atteintes hépatiques (nécrose) et rénales (tubulopathie) peuvent également intervenir.
Un potentiel génotoxique a été mis en évidence.
= classé en liste 2B (IARC) VME : 10 ppm.

F. Trichloroéthane ($CCl_3—CH_3$)

Il existe sous forme de deux isomères, le 1-1-1 trichloroéthane ou méthylchloroforme étant le plus utilisé en milieu industriel. En raison d'une relativement faible toxicité, son utilisation ne cesse de se développer grâce à ses propriétés dégraissantes vis-à-vis des métaux et des fibres naturelles ou synthétiques.
Le méthylchloroforme (ou T111) est un liquide incolore, à odeur chloroformique présentant une certaine volatilité. Il nécessite d'être stabilisé.

1. Toxicité

Des cas d'encéphalopathie ont été rapportés chez des sujets exposés sur une longue période au solvant.
Une sensibilité particulière du myocarde à l'adrénaline est signalée lors d'exposition répétée à ce solvant.
Le composé est dépourvu de potentialités tératogènes.
Le potentiel mutagène peut être considéré comme négligeable et aucun effet cancérigène n'a été mis en évidence chez les rongeurs.
Si la toxicité de ce solvant peut être considérée comme faible, son impact sur la déplétion de la couche d'ozone est très élevé, ce qui conduit à limiter son utilisation jusqu'à son interdiction en 2005 suivant le protocole de Montréal.
VME : 300 ppm.

G. Monochloréthylène ($CH_2{=}CHCl$)

Plus connu sous le nom de chlorure de vinyle, son utilisation est très spécifiquement liée à sa polymérisation en chlorure de polyvinyle (PVC). Compte tenu de sa très haute toxicité, son exposition demeure très réglementée. Un haut niveau de pureté, précisant la teneur limite en monomère, est exigé lors de l'utilisation du polymère par l'industrie alimentaire.
À température ordinaire, il se présente sous forme d'un gaz.

1. Métabolisme

Dans l'organisme, il subit une oxydation par le cytochrome P-450 (CYP 2E1) au niveau de sa liaison éthylénique conduisant à la formation d'un métabolite époxydé instable jouant un rôle clé dans la toxicité de la molécule vis-à-vis de l'ADN. Ce dernier forme du *chloroacétaldéhyde* qui, par oxydation, se transforme en *acide monochloracétique* (MCA) et par réduction en *monochloroéthanol* (MCE). Une voie secondaire par le biais du glutathion conduit à la formation de N-acétylvinylcystéine et d'acide thioglycollique.

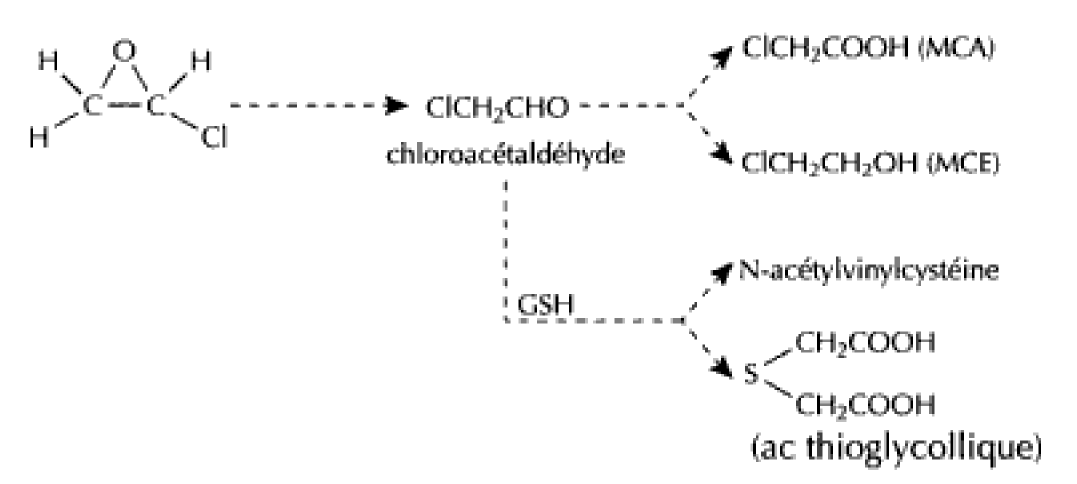


Figure 5. Formation des métabolites urinaires à partir du dérivé époxydé

2. Toxicité

Les premières manifestations toxiques rapportées consistaient en des atteintes nerveuses (troubles de la sensorialité), respiratoires (bronchite chronique) et cutanées (dermatoses allergiques).
Par la suite, une *acroostéolyse*, syndrome douloureux d'origine vasomotrice au niveau des dernières phalanges, a été observée chez les sujets chargés du « décroutage » des cuves de polymérisation.
À partir de 1971, les premiers cas d'*angiosarcome du foie* sont apparus chez les sujets exposés depuis de très longues années au chlorure de vinyle monomère.
Des réponses auto-immunes sont également rapportées se traduisant cliniquement par la survenue d'un syndrome sclérodermique (sclérose de la peau, fibrose pulmonaire ou fibrose du foie et de la rate).
= classé en liste 1 (IARC) VME : 1 ou 3 ppm.

H. Trichloréthylène ($CHCl{=}CCl_2$)

Son importance industrielle est considérable reposant sur ses propriétés solvantes des graisses, décapantes des métaux, extractives dans l'industrie alimentaire et détachantes dans les teintureries. Il peut être considéré comme un contaminant mineur de l'air et de l'eau de boisson dans certains pays.
Le trichloréthylène (TRI) est un liquide incolore d'odeur caractéristique, présentant une importante volatilité et une certaine instabilité chimique (auto-oxydation, photodissociation, décomposition à chaud) nécessitant l'adjonction de stabilisants.

1. Métabolisme

Il est rapidement et fortement absorbé par voie pulmonaire avec une rétention d'environ 75 % et de manière significative par voie cutanée en cas de contact direct. Il traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (effet anesthésique) et fœto-placentaire.
La première étape de son métabolisme passe par une époxydation par le cytochrome P-450 (CYP 2E1) en un dérivé instable le *trichloréthylène oxyde* qui se transforme rapidement en *trichloroacétaldéhyde* (hydrate de chloral). Ce dernier ayant une brève demi-vie, conduit par oxydation (aldéhyde déshydrogénase) à l'*acide trichloracétique* (TCA) ou par réduction au *trichloréthanol* (TCE) éliminé sous forme de glucuronide. Ces deux métabolites sont retrouvés dans l'urine avec des cinétiques d'élimination très différentes, la demi-vie étant de 10 heures pour le TCE et de 52 heures pour le TCA. Le rapport entre les deux métabolites est en faveur du TCE (2:1) en début d'exposition. La formation intermédiaire d'un dérivé chlorure de dichloroacétyl (Cl_2CCOCl) éliminé en acide dichloroacétique (DCA) est envisagée comme mécanisme possible de toxicité.

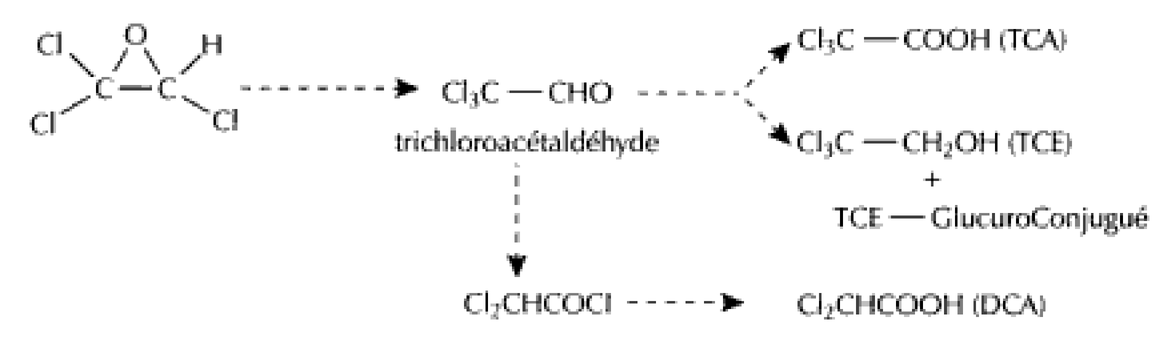


Figure 6. Formation des métabolites urinaires à partir du dérivé époxydé (trichloréthylène oxyde)

2. Toxicité

a) Intoxication aiguë

Les effets sur le SNC sont particulièrement marqués débutant par une phase d'ivresse (recherchée par certains toxicomanes) suivie d'une dépression plus ou moins profonde allant des troubles de la conscience jusqu'au coma. Des troubles de l'excitabilité myocardique sont souvent rapportés en cas de forte exposition associée à des stimulations adrénergiques.
Des élévations modérées des transaminases peuvent se manifester.

b) Exposition chronique

Dans les situations d'exposition professionnelle, trois aspects méritent une surveillance :

■ *Système nerveux*

Des céphalées, des pertes de mémoire peuvent être rapportées lors d'expositions supérieures à la valeur moyenne d'exposition de 75 ppm. Des tests psychophysiologiques mettent en évidence des troubles de l'attention, de la mémoire et des altérations de la perception.
Des atteintes des nerfs périphériques (nerfs crâniens) et des polynévrites ont été parfois observées. Le rôle possible d'un produit de décomposition (dichloroacétylène) a été discuté.

■ *Fonction cardiaque*

Des troubles du rythme ont été mis en évidence chez des sujets exposés professionnellement au trichloréthylène. Un effet-dose avec les taux d'élimination de métabolites urinaires a été démontré.

■ *Tissu cutané*

Comme pour la plupart des solvants appartenant à cette famille chimique, des dermatoses récidivantes avec quelques cas d'eczémas, sont souvent rapportées, en cas de contact répété sans protection.
Le trichloréthylène est dépourvu de potentialités génotoxiques en l'absence de stabilisants. Chez la souris, des carcinomes hépatocellulaires ont été mis en évidence pour de fortes doses par gavage. Des tumeurs rénales et des cellules de Leidig sont rapportées chez le rat après inhalation mais pas par gavage.
Une potentialisation de la toxicité du trichloréthylène peut s'observer avec une exposition concomitante de disulfiram ou d'alcool éthylique par interférence métabolique (inhibition compétitive avec l'alcool et l'aldéhyde déshydrogénase).
L'évaluation des 2 marqueurs biologiques urinaires donne une bonne appréciation du degré d'exposition :
TCE : ≤ 125 mg/g creat (en fin de journée) *TCA : ≤ 75 mg/g creat* (en fin de semaine).
VME : 75 ppm

I. Tétrachloroéthylène ($CCl_2{=}CCl_2$)

Ses utilisations sont proches de celles du trichloréthylène.
Il est connu également sous le nom de perchloréthylène (PER). C'est un liquide incolore, à forte densité, très liposoluble et offrant une meilleure stabilité chimique que le trichloréthylène.

1. Métabolisme

Il est calqué sur celui du TRI. Après formation d'un intermédiaire époxydé (tetrachloréthylène oxyde), il se forme du *trichloroacétaldéhyde*. La différence porte sur l'élimination urinaire puisque seul le *TCA* est retrouvé. Il est également rapporté la formation d'un métabolite intermédiaire chlorure de trichloroacétyle (CCl_3COCl)

s'éliminant en TCA. Il est peu métabolisé, la majeure partie inhalée étant éliminée par l'air expiré (environ 70 %).

Figure 7. Métabolisme du tétrachloréthylène à partir du dérivé époxydé (tétrachloréthylène oxyde)

2. Toxicité

Compte tenu de sa très forte liposolubilité, son impact nerveux sera particulièrement marqué. Il pourra également induire des troubles du rythme myocardique. Des réactions cutanées sont rapportées en cas de contact prolongé.
= classé en liste 2B (IARC) VME : 50 ppm

Pour en savoir plus

- Bolt HM, Gansewendt B. Mechanisms of carcinogenicity of methyl halides. Crit Rev in Toxicology 1993 ; 23 (3) : 237-253.
- Casarett & Doull'S. Toxicology. The basic science of poisons. 5th edition. McGRAW-Hill Companies 1996 ; 1111 pages.
- Connelly JC, Hasegawa R, McArdle JV, Tucker ML. ICH Guideline « residual solvents ». Pharmeuropa 1997 ; 9,1, S1-S68.
- Davidson IWF, Beliles RP. Consideration of the target organ toxicity of trichlorethylene in terms of metabolite toxicity and pharmacokinetics. Drug Metabol. Reviews 23 (5 & 6) 1991 ; 493-599.
- Houze P. Toxicologie des solvants chlorés. Toxicologie tome 1 1993 ; 285-309. Collec tion Le Moniteur Internat.
- Who IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Lyon 1996.
- Wolf DC, Butterworth BE. Risk assessment of inhaled chloroform based on its mode of action. Toxicol. Pathol 1997 ; 25 (1) : 49-52.

Toxicologie pulmonaire

N. EMERY, M. LHERMITTE
Laboratoire de toxicologie, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Lille.

Le poumon, organe protégé par l'arbre respiratoire et l'architecture des voies nasales, est constitué de plusieurs types cellulaires. Sa large surface riche en capillaires permet l'échange des gaz (oxygène et gaz carbonique) entre l'atmosphère et le sang et le retrait d'un certain nombre de composés endogènes. De par sa situation anatomique, le poumon est un organe cible pour de nombreux produits chimiques, ceci est dû à sa grande surface et au volume de gaz filtré au niveau de cette surface (10 000-20 000 L/jour, pour un adulte). Le poumon constitue une interface importante entre l'organisme et l'environnement.

L'homme « industriel » est exposé à un nombre croissant d'agents de l'atmosphère (toxiques de l'environnement), qu'il inhale, tels que gaz, vapeurs, et particules si petites soit elles, comme les poussières (silice, charbon, sucre, coton, amiante...), ou les sels de métaux lourds, sans oublier la fumée de cigarette. Ces irritants altèrent le tissu bronchique et provoquent inflammation et œdème Une exposition continue, notamment à certains de ces produits, peut conduire à une fibrose interstitielle, et dans quelques cas à un cancer pulmonaire. Pour l'amiante, on constate ainsi une fibrose pulmonaire interstitielle et un mésothélium pleural.

Le poumon peut aussi être exposé à des xénobiotiques toxiques, absorbés par voie générale, transportés à son niveau après métabolisation dans un autre organe (le foie) ou activés par métabolisation dans le poumon lui-même.

Les intoxications aiguës pulmonaires sont très étudiées en expérimentation animale. En revanche, le cas de l'exposition à de petites quantités de toxiques pendant des périodes très longues, exposition pouvant être intermittente, est difficile à quantifier.

La nature de l'atteinte respiratoire et sa sévérité sont conditionnées par de multiples facteurs. La nature est fonction du site d'action de l'agent toxique. Sil s'agit d'un gaz, la solubilité dans l'eau est déterminante. L'ammoniac (NH_3) ou l'anhydride sulfureux (SO_2) sont rapidement absorbés par les voies respiratoires supérieures et donnent des signes traduisant l'irritation des muqueuses. Un gaz peu soluble comme, l'ozone (O_3), les oxydes d'azote (NOX) ou le phosgène ($COCl_2$) sera peu absorbé au niveau bronchique et exercera l'essentiel de son action au niveau des alvéoles pulmonaires. Lorsqu'il s'agit de substance inhalée sous forme d'aérosols, c'est la taille des gouttelettes ou des particules qui déterminent le lieu d'action. Seules pénètrent dans le poumon profond les particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 µm.

L'intensité de l'exposition est importante à considérer. Une exposition massive à n'importe quel gaz irritant, quelle que soit sa solubilité dans l'eau, peut déterminer des lésions alvéolo-capillaires et un œdème pulmonaire lésionnel. Interviennent aussi la concentration atmosphérique du produit, le temps de contact, le mode ventilatoire de la victime (la quantité inhalée est proportionnelle au degré d'hyperventilation).

Les caractères chimiques : acidité ou alcalinité, réactivité chimique, capacité à donner des radicaux libres oxydants, sont également à prendre en compte.

Le degré de réponse des tissus lésés peut être modifié par des maladies préexistantes, qui peuvent, par exemple, altérer le revêtement mucociliaire bronchique.

La susceptibilité individuelle semble également importante, mais est mal connue. Un déficit en α-1-antitrypsine a été évoqué comme facteur prédisposant.

I. Toxicité pulmonaire des gaz, vapeurs, aérosols, fumées et poussières organiques

Elle est à l'origine de syndromes irritatifs, de fièvres et/ou d'œdèmes pulmonaires.

A. Syndromes irritatifs

Les irritants respiratoires forment un groupe hétérogène de gaz et d'aérosols, dont le point commun est de générer une réaction inflammatoire des muqueuses des voies aériennes. L'irritation peut entraîner un spasme bronchique, une inflammation des muqueuses ou encore d'autres réponses non spécifiques, mais réversibles. Les premiers signes (toux, dyspnée sibilante) apparaissent quelques minutes à quelques heures après le début de l'exposition.
Les manifestations respiratoires sont rarement isolées, mais associées à des symptômes montrant l'irritation d'autres muqueuses : oculaires, nasales, laryngées, voire digestives. L'évolution fréquente est la rétrocession de tous les symptômes en quelques heures, mais la survenue d'un OAP (œdème aigu du poumon) retardé demande une surveillance de 24 heures.

B. « Asthmes non immunologiques »

Ils surviennent à la suite d'inhalations aiguës de produits irritants ; ils peuvent persister plusieurs mois, voire plusieurs années ; ils traduisent une hyperréactivité bronchique. Pour caractériser ces asthmes non immunologiques, le terme de « SDRA » (syndrome de détresse respiratoire aiguë) a été proposé, assorti de plusieurs critères diagnostiques :
- absence de manifestations respiratoires antérieures ;
- après une exposition unique à un toxique ;
- le toxique est un gaz, une fumée ou une vapeur, à fortes concentrations et doué de propriétés irritantes ;
- apparition de symptômes dans les 24 heures et persistance au moins 3 mois ; symptôme à type d'asthme, avec toux, sibilances, dyspnée ;
- possibilité de trouble ventilatoire obstructif ;
- test à la métacholine positif ;
- élimination d'autres causes respiratoires.

Dans ce cas, on constate une desquamation bronchique et bronchiolaire, une hyperplasie des cellules à mucus, une infiltration des cellules plasmatiques et des lymphocytes. Les autres anomalies présentes dans l'asthme ne sont pas retrouvées. La survenue de ces signes, dès la première exposition, permet d'écarter un mécanisme allergique. La fréquence des SDRA représente 3 à 6 % des asthmes professionnels. Les principaux toxiques responsables sont répertoriés dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Agents étiologiques du SDRA (Ameille, 1993)

Acide acétique	Fumées d'incendie	Isocyanates : toluène de diisocyanate
Acide sulfurique	Fumées de soudure	Diphenylméthane diisocyanate
Ammoniac	Gaz lacrymogène	Oxyde d'éthylène
Anhydride sulfureux	Hexafluorure d'uranium	Phosgène
Chlore	Hydrazine	Pistolage des peintures

C. Fièvres isolées transitoires

■ *Fièvres des métaux*

L'inhalation de fumées d'oxydes métalliques entraîne des syndromes fébriles transitoires dénommés « fièvre des métaux », « fièvre de fondeurs » ou « fièvre des soudeurs ». Cette affection bénigne, non spécifique est rencontrée après inhalation des fumées d'oxydes de zinc (le plus fréquent), de cuivre, de magnésium, d'aluminium, d'antimoine, de fer, de manganèse, de nickel, de sélénium, d'argent, d'étain ou de cadmium. Ils surviennent chez les soudeurs et les fondeurs, mais également dans des activités de bricolage.

Quatre à 6 heures après exposition, on constate des irritations des voies aériennes supérieures, une sensation de malaise avec oppression thoracique et fièvre (39-40 °C). D'autres symptômes sont possibles : frissons, céphalées, myalgies, nausées, vomissements, sensation de goût métallique dans la bouche. La fièvre et l'hyperleucocytose atteignent leur maximum 9 à 12 heures, après le début de l'exposition.

Ces symptômes sont résolutifs en 24 heures (48 heures au plus). La guérison, sans séquelle, survient sans traitement. Il existe une susceptibilité individuelle. Un arrêt de travail fait disparaître ce phénomène : « fièvre du lundi ».

La pathogénie de la fièvre des métaux est incomplètement élucidée. Elle est probablement causée par une activation des macrophages et une sécrétion de cytokines comme le TNF (*tumor necrosis factor*). La fièvre des métaux ne doit pas être confondue avec les pneumopathies induites par certains métaux (cadmium) ou les pneumopathies d'hypersensibilité dues aux oxydes de zinc.

D. Syndrome toxique des poussières organiques

Encore appelé mycotoxicose pulmonaire, il réalise un syndrome grippal, non allergique et non infectieux. Il peut succéder à une exposition unique et massive à différentes poussières agricoles, contaminées de spores fongiques. Ce syndrome est rencontré après déchargement de silos, après exposition à des grains moisis, au coton ou aux poussières de bois.

Ce syndrome est caractérisé par une fièvre, des frissons, une sensation de malaise, des céphalées, une toux rare, une dyspnée modérée, débutant quelques heures après le début de l'exposition.

Le tableau clinique est proche de la maladie du poumon de fermier, mais n'est pas associé à la présence d'anticorps précipitants, et les symptômes régressent spontanément en quelques heures à quelques jours, sans évolution vers la fibrose.

La pathogénie est mal connue. Il est vraisemblable que des cytokines interviennent, consécutives à une réaction inflammatoire provoquée par les composants toxiques ou des contaminants bactériens et fongiques.

E. Fièvre des polymères

Il s'agit d'une fièvre pseudogrippale, causée par les produits de pyrolyse du polytétrafluoroéthylène ou téflon, similaire à la fièvre des métaux avec frissons, difficultés respiratoires et irritation des voies aériennes supérieures, quelques heures après inhalation des produits de pyrolyse. Tout rentre dans l'ordre en 24 à 48 heures.

F. Œdèmes pulmonaires lésionnels

■ *Physiopathologie et diagnostic*

Ils sont caractérisés par une accumulation de liquide d'origine plasmatique dans l'interstitium pulmonaire et dans les alvéoles à un stade plus avancé. Il s'agit d'œdèmes lésionnels, par opposition aux œdèmes hémodynamiques. Il y a en effet une agression directe de l'épithélium alvéolaire par les agents toxiques, provoquant une augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire permettant le passage dans l'interstitium et les alvéoles d'un liquide riche en protéines.
Les symptômes apparaissent 12 à 48 heures après le début de l'exposition et succèdent à un syndrome irritatif. La toux et la dyspnée sont constantes, accompagnées souvent d'hyperthermie. La cyanose et les râles crépitants sont présents ou inconstants. L'image thoracique est anormale. On trouve aussi une hypoxémie accompagnée d'une hypocapnie.
Les étiologies sont nombreuses (*tab.* 2). À forte concentration, à peu près tous les gaz irritants, fumées ou vapeurs métalliques sont susceptibles d'induire un œdème pulmonaire lésionnel.
L'évolution est variable. La plus fréquente est la guérison sans séquelles en quelques jours à quelques semaines. Il arrive aussi que les sujets guérissent mais au prix de séquelles soit avec une bronchiolite oblitérante (anhydride sulfureux, ozone, vapeurs nitreuses, ammoniac, phosgène, isocyanate de méthyle, fumées d'incendie ou combustion de matières plastiques) soit, avec évolution fibrosante et constitution de bronchiectasie (dilatation des bronches). Enfin dans les cas les plus graves, la mort survient de façon plus ou moins rapide.

Tableau 2. Étiologies des œdèmes aigus pulmonaires toxiques (Ameille, 1993)

Métaux, métalloïdes	Autres agents
Acide chromique	Acétaldéhyde
Béryllium	Acide chlorhydrique
Cadmium	Acide fluorhydrique
Chlorure de zinc	Acroléine
Cobalt	Ammoniac
Hydrure de lithium	Anhydride sulfureux
Manganèse	Anhydride trimellique
Mercure	Bromure d'hydrogène
Nickel carbonyl	Bromure de méthyle
Osmium	Chlore
Pentoxyde de vanadium	Diméthyl sulfate
Sélénium	Dioxane
Tétrachlorure de titane	Hydrocarbure
Tétrachlorure de zirconium	Hydrogène sulfuré
Trichlorure et pentachlorure d'antimoine	Isocyanates
	– toluène de diisocyanate
	– isocyanate de méthyle
	Organophosphorés
	Oxydes d'azote
	Oxyde de carbone
	Ozone
	Paraquat
	Phosgène
	Polytétrafluoroéthylène

G. Étiologies

Les manifestations respiratoires aiguës toxiques dues aux gaz Irritants et aux isocyanates sont rapportées dans le *tableau 3.*

Tableau 3. Manifestations respiratoires aiguës toxiques dues aux gaz irritants et aux isocyanates (Ameille, 1993)

Produit	Syndrome irritatif	SDRA	Œdème lésionnel	Bronchiolite oblitérante	Bronchiectasie
Ammoniac	+++	+	+	+	+
Anhydride sulfureux	+++	+	+	+	+
Phosgène	+	+	+++	±	–
Vapeurs nitreuses	+	–	+++	+	–
Isocyanates	+++	+	+++	+	–

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë.

1. Ammoniac (NH_3)

Gaz incolore, plus léger que l'air, très soluble dans l'eau, très utilisé dans l'industrie chimique et pharmaceutique pour la fabrication d'engrais, de matières plastiques d'explosifs… Son odeur forte permet aux travailleurs d'échapper aux intoxications aiguës, qui sont plutôt d'origine accidentelle, rupture de canalisation de citernes, fuites ou accidents de transport.
À cause de sa très grande solubilité, l'ammoniac est responsable de brûlures des yeux, de l'oropharynx et de la trachée. Quelquefois des œdèmes pulmonaires lésionnels, parfois hémorragiques ont été constatés lors d'expositions massives, avec en second lieu des infections bactériennes. Les séquelles à type de bronchiectasies sont fréquentes.

2. Anhydride sulfureux (SO_2)

Gaz incolore plus lourd que l'air, soluble dans l'eau, il se forme à chaque fois que du soufre est brûlé en présence d'oxygène. La combustion du charbon et des hydrocarbures qui contiennent des dérivés soufrés donne de l'anhydride sulfureux, le principal polluant des grandes agglomérations. Dans l'industrie, on l'utilise comme agent de blanchiment du papier, fumigeant, réfrigérant…
Il est irritant pour les muqueuses, réagissant avec l'eau, il forme de l'acide sulfurique. 90 % du gaz est absorbé au niveau des voies respiratoires supérieures.
L'inhalation fait apparaître un syndrome irritatif des muqueuses oculaires, nasales et des voies aériennes supérieures ainsi qu'une bronchite. Une intoxication aiguë peut provoquer un œdème pulmonaire lésionnel. Dans les complications, on a rapporté des asthmes persistants et des bronchiectasies.

3. Phosgène ($COCl_2$)

Gaz incolore, plus lourd que l'air, il possède une odeur caractéristique de foin moisi ou de blé fraîchement coupé. Peu soluble dans l'eau, il exerce ses effets toxi-

ques au niveau du parenchyme pulmonaire, n'étant pas piégé par les muqueuses bronchiques.
Utilisé comme gaz de combat lors de la Première Guerre mondiale, il trouve son emploi dans les synthèses pour la production d'isocyanates et des résines polycarbonées, dans la fabrication d'insecticides, de colorants... Dans l'industrie, il est liquéfié sous pression et stocké dans des récepteurs en acier hermétiquement clos. Les accidents surviennent lors d'erreurs de manipulations et de fuites. Le risque d'œdème est augmenté du fait que l'irritation des muqueuses oculaires et bronchiques est discrète et non alarmante.

4. Oxydes d'azote

L'oxyde nitrique (NO), le peroxyde d'azote (NO_2), le protoxyde d'azote (N_2O), utilisé comme anesthésique, l'anhydride azoteux (N_2O_3) et l'anhydride azotique (N_2O_5) peuvent être formés.
Les plus fréquents sont NO et NO_2. Les circonstances principales de l'intoxication par les vapeurs nitreuses sont la déflagration dans les mines, l'action de l'acide nitrique sur les métaux, la combustion des corps organiques nitrés, la fermentation des jeunes plants à haute teneur en nitrates.
Les vapeurs n'entraînent qu'un syndrome irritatif. Les intoxications massives peuvent être responsables de décès précoces liés à une asphyxie secondaire à une méthémoglobinémie. Plus souvent, après 3 à 36 heures, on constate un œdème pulmonaire lésionnel.

5. Isocyanates (R-NCO)

Ce sont des molécules très réactives à nombreuses applications industrielles, sous forme de diisocyanates pour la fabrication des polyuréthanes. L'isocyanate de méthyl est utilisé dans la synthèse des pesticides. Ce sont des irritants respiratoires puissants (à partir de 0,5 ppm chez l'homme). Ils induisent aussi un œdème pulmonaire.
La tragédie de Bhopal en Inde est arrivée le 3 décembre 1984, et est consécutive à une fuite d'isocyanate de méthyle dans une usine de fabrication de pesticides, suite à une erreur de manipulation. En quelques heures, plusieurs dizaines de tonnes de ce produit se répandent dans l'atmosphère, formant un nuage de 40 km^2. Le nombre des victimes demeure imprécis. Officiellement 1 800, peut-être entre 2 500 et 5 000, le nombre de sujets intoxiqués aurait été de 200 000. La cause des décès serait un œdème pulmonaire avec destruction et nécrose des parois alvéolaires et ulcération des muqueuses bronchiques. Chez les survivants, on remarque fibrose interstitielle et bronchiolite oblitérante.

6. Fumées d'incendie

Les victimes d'incendie et les pompiers sont fréquemment atteints de complications respiratoires, résultant d'une agression thermique et chimique. Les brûlures chimiques sont (sauf troubles de la conscience) limitées aux voies aériennes sus-glottiques. Les lésions chimiques résultent de la toxicité des gaz inhalés. Leur composition est complexe, variable selon les matériaux brûlés. La phase gazeuse asso-

cie des irritants comme l'acroléine, l'ammoniac, le chlore, l'acide chlorhydrique, le dioxyde d'azote, l'anhydride sulfureux, les isocyanates et des asphyxiants comme l'oxyde de carbone et l'acide cyanhydrique.
Lors d'intoxication par les fumées d'incendie, les symptômes initiaux associent toux, dyspnée, céphalées et nausées. Ils sont régressifs dans les 24 heures La persistance doit faire redouter un œdème lésionnel, pouvant survenir même en l'absence de syndrome irritatif.

II. Pneumoconioses

Les pneumoconioses constituent un groupe de maladies résultant de l'inhalation de poussières minérales. Parmi les pneumoconioses malignes, les plus connues sont la silicose et l'asbestose, maladies pour lesquelles la fibrose est un facteur central.

A. Silicose

La silicose est provoquée par la silice libre (SiO_2) sous forme cristalline. On distingue deux formes de silice fibre : la forme cristalline (quartz, tridymite, cristobalite) responsable de pneumoconioses malignes et la forme amorphe (terre de diatomées...), non dangereuse. Cependant, il faut noter qu'après calcination à haute température, la terre de diatomée est transformée en silice très fibrogénique : la tridymite et la cristobalite.

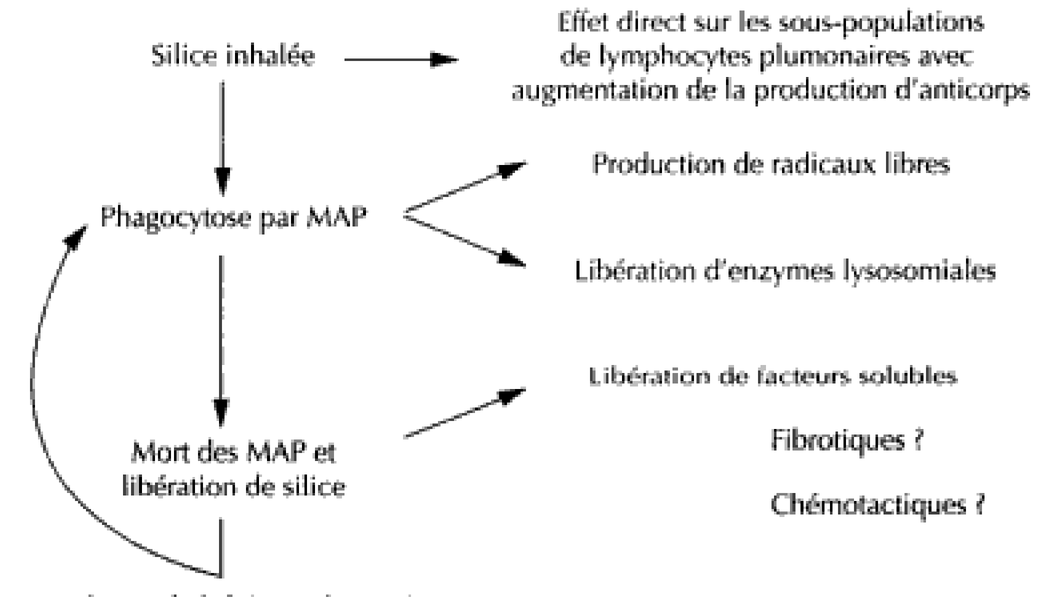
1. Sources d'exposition

Elles sont nombreuses, on peut citer : les travaux souterrains, le travail dans les carrières de quartz, d'arkose, de grès..., les fonderies, les fabriques de porcelaine, de faïence, la réparation et la démolition des fours de hauts fourneaux, les verreries, les cristalleries, le broyage du sable, l'industrie de la construction, etc.
La silicose est souvent diagnostiquée sur les manifestations radiologiques qui précèdent bien souvent les symptômes cliniques.
En général, les symptômes cliniques n'apparaissent qu'après plusieurs années (10 à 15 ans) d'exposition, bien que dans des cas d'empoussiérage massif, des silicoses graves puissent se développer après quelques mois d'exposition. Le symptôme subjectif le plus caractéristique est la dyspnée, au début, limitée à l'effort, à un stade avancé, elle devient permanente, entraînant une incapacité de travail totale. L'état général s'altère : amaigrissement, asthénie. Le patient se plaint de toux et de douleurs thoraciques.

2. Pathogénie de la silicose

La silicose est connue depuis l'antiquité, mais de nombreuses inconnues subsistent sur la nature précise du développement des lésions pulmonaires. De nombreuses théories basées sur une ou plusieurs caractéristiques des particules de silice ont été avancées, elles portent sur les caractères physico-chimiques, la solubilité et la

structure cristalline. La théorie généralement admise propose que la toxicité pulmonaire des particules de silice résulte de leur action sur les macrophages alvéolaires pulmonaires. Ces cellules, dont le rôle essentiel est le maintien de la stérilité des voies respiratoires et la phagocytose des débris cellulaires et des corps étrangers, se caractérisent par une activité de surface importante associée au phénomène d'endocytose et la synthèse intracellulaire d'enzymes lysosomiales nécessaires à la digestion du matériel phagocyté. Les particules de silice altèrent les membranes des lysosomes, permettant la libération des enzymes hydrolytiques et la lyse des macrophages. Un mécanisme de lipopéroxydation peut aussi être avancé. *In vitro*, la silice catalyse la formation de lipopéroxydes dans les macrophages alvéolaires et dans les érythrocytes favorisant leur hémolyse. Quel que soit le site d'action primaire, la conséquence est la lyse de certains macrophages qui ont phagocyté des particules de silice et la libération de ces dernières.
En même temps, des facteurs solubles, sécrétés par les macrophages lysés, recrutent les cellules de l'inflammation ; notamment, les neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire sont libérés, et la silice libre libérée par les macrophages tués est phagocytée par d'autres macrophages alvéolaires pulmonaires ou par de nouveaux macrophages et neutrophiles recrutés dans le poumon. Ce phénomène entraîne une réaction en chaîne : phagocytes, mort des macrophages… (*fig. 1*).
La persistance de la silice dans le poumon par ces mécanismes résulte dans le maintien de l'inflammation, l'altération du parenchyme et la fibrose.
De plus, les macrophages libèrent un facteur stimulant la production de collagène. Suite à la mort des macrophages, plusieurs réactions se produisent conduisant à la constitution d'un nodule sicolitique : apparition de fibrocytes et production de fibres de collagène, apparition de plasmocytes autour des amas de macrophages, précipitation de γ-globulines sur les fibrilles de collagène.



MAP : macrophage alvéolaire pulmonaire.

Figure 1. Mécanismes immunologiques possibles intervenant dans la silicose

L'augmentation d'anticorps a également été montrée après exposition à la silice dans plusieurs espèces animales. Les patients atteints de silicose ont une augmen-

tation du taux des immunoglobulines. La découverte d'un facteur antinucléaire dans le sérum des silicotiques est un argument supplémentaire en faveur de cette théorie immunitaire.

B. Asbestose

L'asbeste ou amiante est un silicate fibreux dont on distingue six types principaux : la chrysolite ou asbeste blanche, la crocidolite ou asbeste bleue, l'amosite, l'anthophyllite, la trémolite et l'actimolite.
L'intérêt de ce matériau résulte de sa résistance aux acides, de ses propriétés isolantes vis-à-vis de la chaleur et de l'électricité. La longueur et la résistance à la traction des fibres de chrysolite permettent son tissage. L'asbeste peut être mélangée à de nombreux produits (ciment, caoutchouc, matières plastiques…) pour en modifier les propriétés.

1. Sources d'exposition

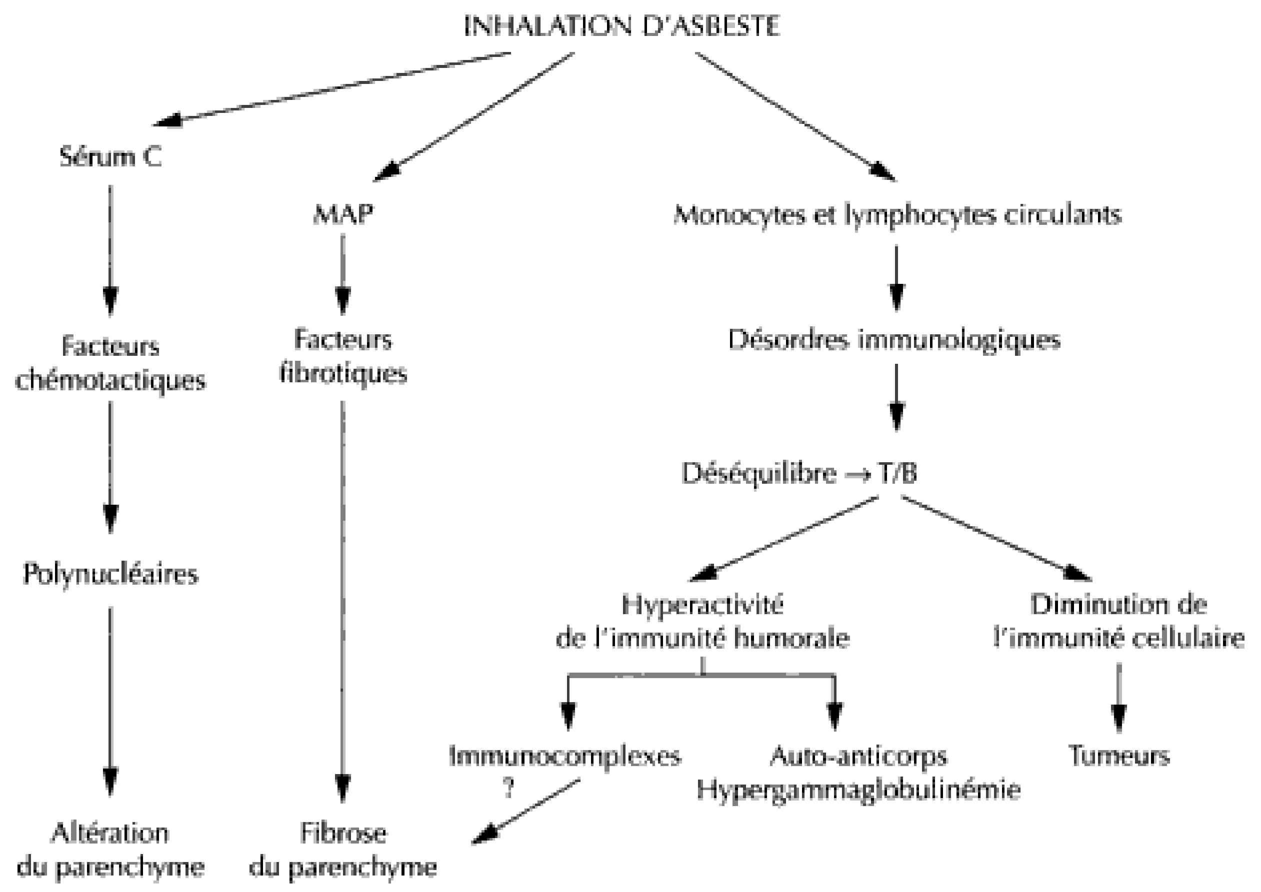
Les plus importantes sont :
- l'extraction, le broyage, le concassage, le tamisage, et les manipulations de roches amiantifères ;
- le filage et le tissage des fibres servant à la fabrication de vêtements, anti-feu pour pompiers, de cloisons anti-feu… ;
- la fabrication de fibrociment Eternit, l'enlèvement des enveloppes isolantes de chaudières ou de conduites de vapeur (dans les navires, par exemple) ;
- l'industrie de la construction…

L'inhalation de fibres d'asbeste engendre une pneumoconiose très sévère, caractérisée par une fibrose interstitielle progressive et augmente l'incidence de certaines formes de cancer.
L'affection ne débute en général que 10 à 20 ans après le début de l'exposition.
Les manifestations pathologiques résultent de l'inhalation de fibres d'asbeste dont la longueur dépasse au moins 3 µ. Ces fibres induisent une réaction de fibrose, mais sans former de nodules, comme dans la silicose.

2. Pathogénie de l'asbestose

Les différentes théories sur le mécanisme pathogénique de l'asbeste peuvent se résumer ainsi (*fig.* 2). L'interaction entre l'asbeste et les protéines du système du complément pourrait conduire à la sécrétion de facteurs chémotactiques par les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules, attirées dans le parenchyme pulmonaire, libèrent des enzymes lysosomiales et des radicaux libres et provoquent une atteinte du parenchyme pulmonaire. En plus, l'interaction de l'asbeste avec les macrophages alvéolaires pulmonaires libère des facteurs fibrogéniques, augmentant la production de collagène et en induisant la fibrose. Les effets sur les monocytes et les lymphocytes, probablement en rapport avec les changements de la sous-population de lymphocytes T, provoquent un désordre de la régulation immunologique, telle qu'une diminution de l'immunité cellulaire et une augmentation de l'immunité humorale apparaîtrait. Cette dernière expliquerait la produc-

tion d'auto-anticorps, hypergamma-globulinémie, et aussi la formation d'immuno-complexes. Le rôle de ces derniers dans le processus fibrotique n'est pas clair. Le déficit dans l'immunité cellulaire expliquerait l'incidence plus grande des tumeurs chez les sujets exposés à l'asbeste.
Chez l'homme, les complications possibles de l'asbestose sont l'apparition après plus de 30 ans d'exposition de carcinomes broncho-pulmonaires et de mésothéliums pleuraux.



C : complément sérique ; MAP : macrophage alvéolaire pulmonaire ; T/B : lymphocytes T et B.

Figure 2. Mécanismes immunologiques possibles rencontrés dans l'asbestose

III. Xénobiotiques pneumotoxiques après activation métabolique

À côté des substances (décrites ci-dessus), directement irritantes ou fibrosantes pour le poumon, trois mécanismes de toxicité mettant en jeu des xénobiotiques sont décrits.

A. Mécanisme 1

Des composés, inhalés ou véhiculés au poumon par voie générale peuvent être métabolisés par les mono-oxygénases à cytochrome P450 pulmonaires et transformés ainsi en un métabolite réactif (*fig.* 3).

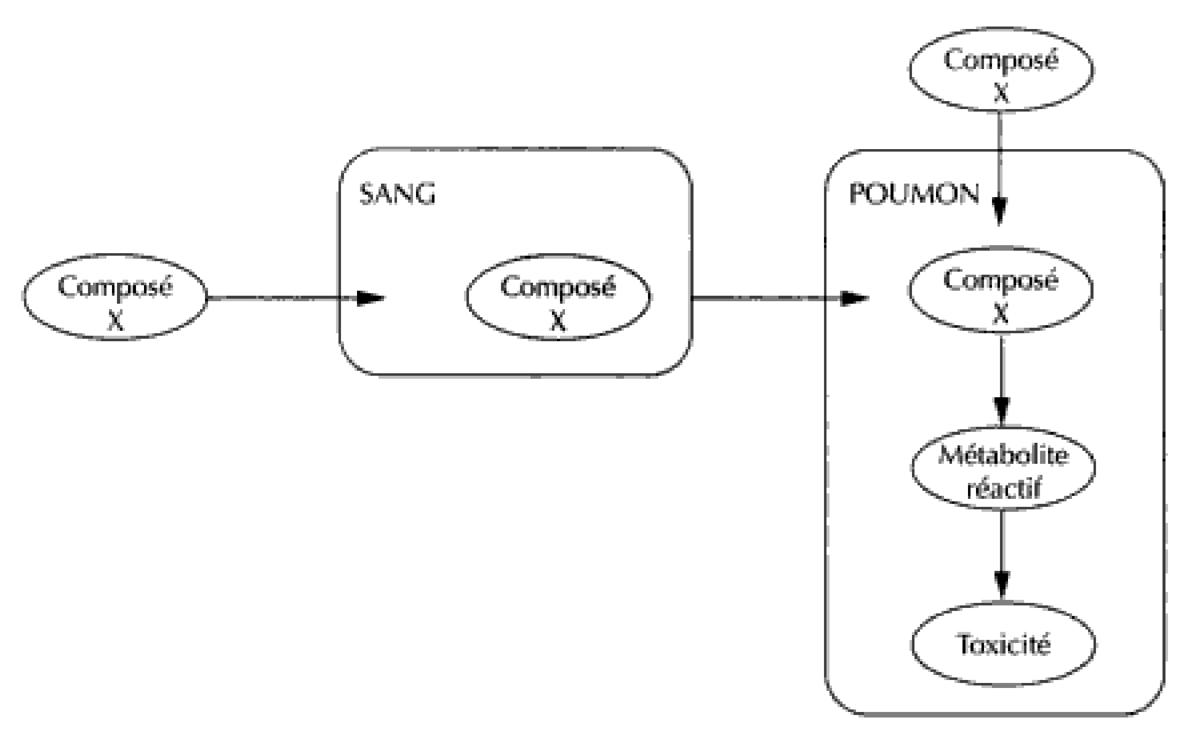


Figure 3. Mécanisme 1 de pneumotoxicité

L'exemple le mieux connu de composé toxique activité au niveau pulmonaire est le 4-ipoméanol (*fig.* 4), composé isolé des pommes de terre contaminées par un champignon *Fusarium solani*. Ce composé est responsable d'atteinte pulmonaire sévère et de mort chez les bovins. L'atteinte pulmonaire est causée non pas par le 4-ipoméanol, mais par un métabolite hautement réactif, probablement un époxyde, formé après action d'isoenzymes à cytochrome P450 (*fig.* 4). Cette activation s'effectue préférentiellement dans le poumon, par certaines isoenzymes à cytochrome P450 exprimées de manière plus importante au niveau pulmonaire, comparativement au foie. Ces isoenzymes sont trouvées dans les cellules de Clara, qui sont les plus atteintes par le 4-ipoméanol.

cyt. P-450

4-Ipomeanol

Figure 4. Bioactivation du 4-Ipoméanol

Cette substance provoque œdème, congestion et hémorragie.
D'autres substances, contaminants atmosphériques, le 2-méthylfurane et le 3-méthylfurane provoquent une toxicité pulmonaire par la formation de métabolites réactifs, probablement de nature aldéhydique.
Le tétrachlorure de carbone et le bromobenzène peuvent aussi subir une activation métabolique au niveau pulmonaire par ce type de mécanisme.
La présence d'isoenzymes à cytochrome P450 dans les cellules de Clara est d'un intérêt très important puisque de nombreux produits chimiques cytotoxiques et

cancérigènes sont activés par ce système enzymatique. Les cellules de Clara sont donc le site de formation d'un métabolite ultime ou cancérigène et peuvent aussi bien être les cellules cibles de ces substances réactives.

B. Mécanisme 2

Le xénobiotique peut être activé dans le foie. Le métabolite réactif étant ensuite transporté par le sang au poumon, où il exerce ses effets néfastes (*fig. 5*). De tels métabolites, bien que très réactifs, peuvent persister assez longtemps pour arriver au poumon. Ces métabolites réactifs se lient de façon covalente et altèrent aussi bien le foie que le poumon. L'exemple le mieux connu de toxicité pulmonaire par ce mécanisme est celui des alcaloïdes de structures pyrrolizidiniques telle que la monocrotaline (*fig. 6*), isolés de certaines variétés de plantes, comme le Senecio. Ce composé provoque une toxicité au niveau des cellules interstitielles du poumon.

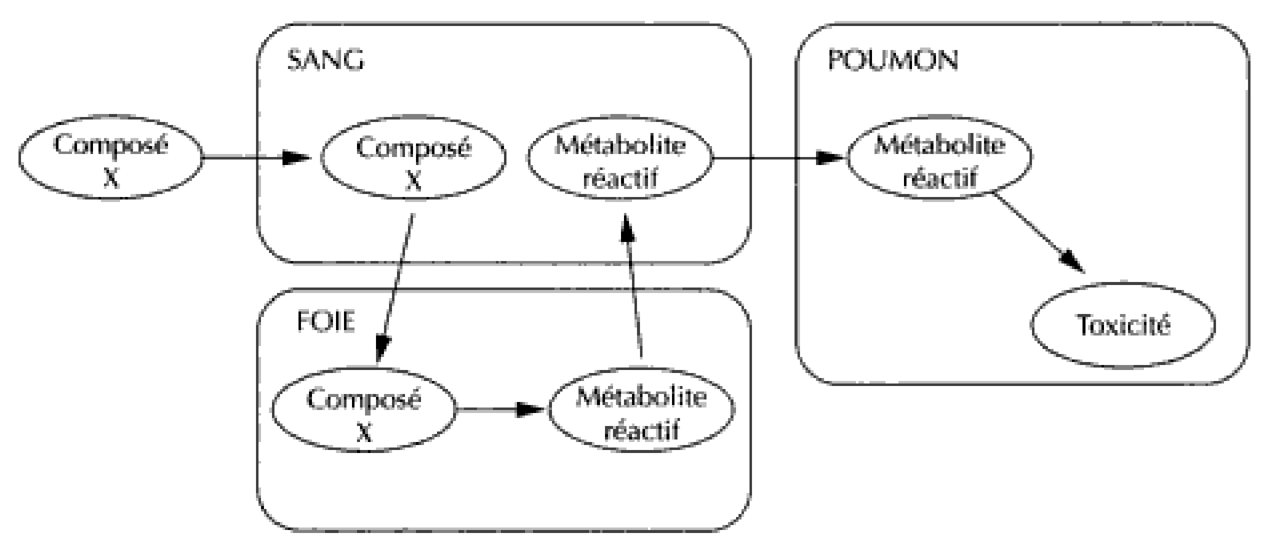


Figure 5. Mécanisme 2 de pneumotoxicité

Figure 6. Structure de la monocrotaline (R = OH)

Les alcaloïdes sont métabolisés en déhydro-pyrrolizidines qui se lient de façon covalente aux macromolécules du foie et du poumon. Expérimentalement, chez la souris, on constate alors une augmentation de la perméabilité capillaire, une prolifération des cellules de la paroi alvéolaire et des signes d'hypertension pulmonaire.

Ces substances représentent un problème économique, car elles contaminent les stocks d'aliments et posent donc un problème de santé publique.

C. Mécanisme 3

Un autre mécanisme d'activation au niveau pulmonaire résulte de la formation d'un métabolite par un cycle d'oxydoréduction (*fig. 7*).

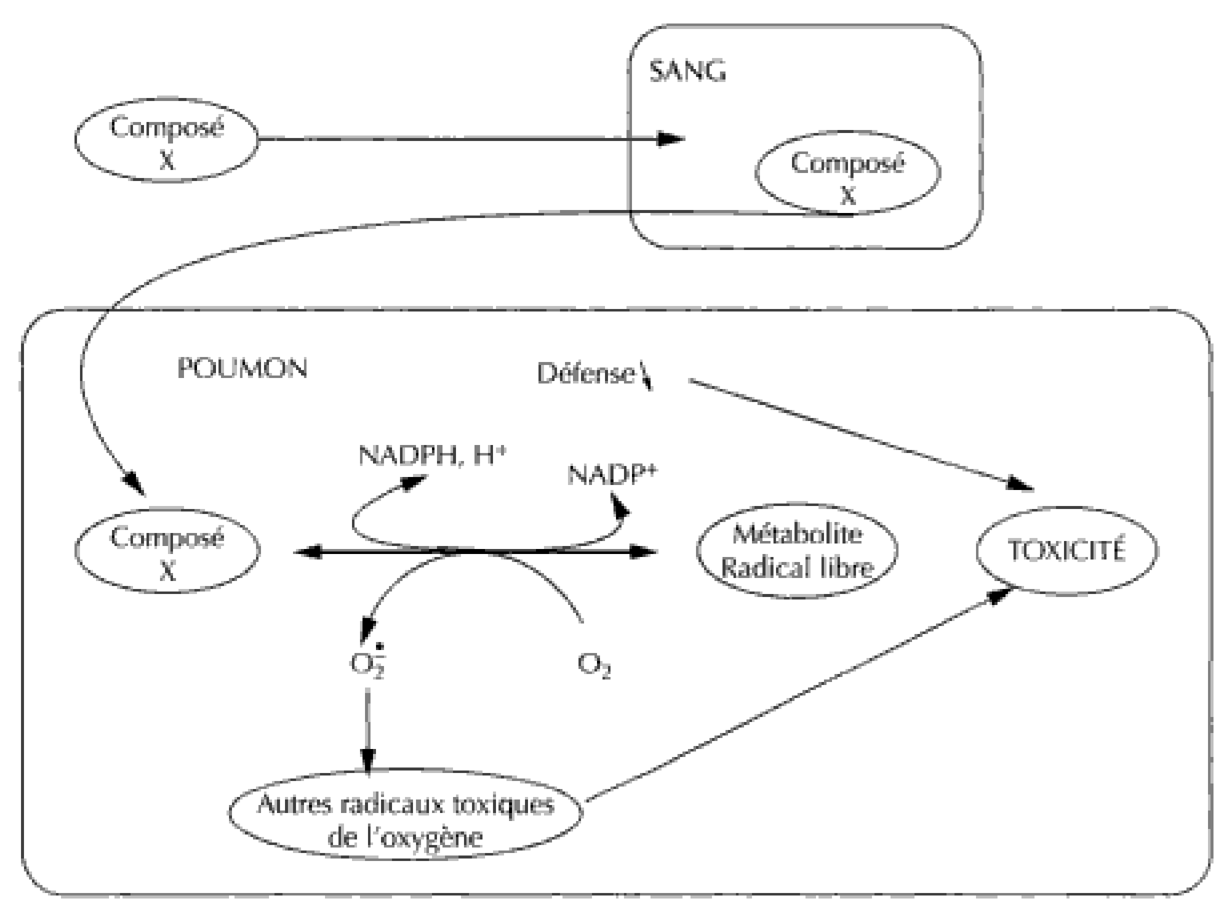


Figure 7. Mécanisme III de pneumotoxicité

Au cours de cette réaction, beaucoup de NADPH, H+ est consommé, et des anions superoxydes et des métabolites toxiques de l'oxygène sont formés. Ainsi une déplétion en NADPH, H+ (stock énergétique) et/ou la formation des radicaux réactifs toxiques de l'oxygène peuvent conduire à l'atteinte pulmonaire. Ce type de mécanisme explique la toxicité pulmonaire du paraquat, substance herbicide (*fig. 8*).

CH_3-N^+ … N^+-CH_3 $\xrightarrow{e^-}$ CH_3-N … N^+-CH_3

Paraquat

$O_2^{\cdot-}$ O_2

Figure 8. Bioactivation du Paraquat

Les lésions dégénératives et potentiellement létales du paraquat s'expliquent donc par la formation des espèces toxiques de l'oxygène (anion superoxyde, anion peroxyde, radical hydroxyle), très réactives pour les macromolécules tissulaires, et notamment à l'origine de la péroxydation lipidique, et par la déplétion en NADPH, H+ et glutathion réduit, nécessaire au fonctionnement tissulaire.

D'autres toxiques pulmonaires, tels que l'oxygène, la bléomycine (un anticancéreux) et la nitrofurantoïne (antibiotique utilisé dans le traitement d'infection urinaire) peuvent être activés par ce mécanisme.

Conclusion

La pathologie respiratoire d'origine toxique regroupe des manifestations très différentes. Elle peut résulter d'une exposition unique à un toxique industriel inhalé sous forme de gaz, de vapeurs ou d'aérosol, qui exerce une action toxique directe sur les voies respiratoires. Elle peut se révéler après une période de latence plus ou moins longue, comme dans le cas des pneumoconioses (silicose ou asbestose), mettant en jeu un mécanisme d'ordre immunologique. Elle peut au contraire demander l'activation métabolique de l'agent agresseur, dans ce cas, trois mécanismes ont été décrits.
D'autre part, il ne faut pas oublier la pathologie cancéreuse. En effet, la fréquence importante de pathologies pulmonaires cancéreuses peut être due aux substances toxiques inhalées qui sont à l'origine des cancers pulmonaires.
Sans aucun doute, la fumée de cigarette est le principal responsable de cancer du poumon chez l'homme. Elle est composée d'un grand nombre de substances, incluant des carcinogènes et des irritants connus.
Les études épidémiologiques indiquent aussi que la fumée de cigarette augmente l'incidence de cancer chez les salariés travaillant dans l'industrie de l'amiante.
Les émissions de cokeries contiennent du benzo(a)pyrène et un certain nombre d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces composés peuvent être métabolisés par les enzymes pulmonaires, mono-oxygénases à cytochrome P450 en intermédiaires réactifs capables d'induire des mutations conduisant à une transformation maligne.
L'action des sels de chromate et de nickel est moins clairement comprise. Le nickel et les composés renfermant du nickel produisent principalement des carcinomes de la cavité basale et suggèrent que les cellules à mucus et les cellules ciliées sont les plus sensibles à cette transformation maligne. De plus, il a été montré que les ions chromate et le nickel divalent se lient facilement à l'ADN.

L'essentiel de la question

Le poumon constitue une interface importante entre l'organisme et l'environnement. L'homme est exposé à un nombre croissant de toxiques de l'environnement qu'il inhale (gaz, vapeur, particules, fumée de cigarette).
Les substances irritantes peuvent altérer le tissu bronchique et provoquer inflammation et œdème.
L'inhalation de poussière de silice ou de fibres d'amiante, en exposition continue, peut conduire à des pathologies pulmonaires (pneumoconioses), pour lesquelles l'intervention de cellules immunocompétentes permet d'expliquer la pathogenèse.
Des xénobiotiques se révèlent pneumotoxiques après activation métabolique au niveau cellulaire pulmonaire, après transport au niveau du poumon ou encore après formation d'un métabolite par un cycle d'oxydoréduction.

Pour en savoir plus

- Menzel D. B., Amdur M. O. « Toxic responses of the respiratory system in Casarett and Doull's Toxicology », in Klaassen C. D., Amdur M. O., Doull J., eds, *The basic Science of poisons*. Macmillan Pubhshing Company 1986 : 330-58.
- Levi P. E. « Toxic action », in Hodgson L., Levi P. E., eds, *Modern Toxicology*. New York, Amsterdam, London, Elsevier, 1987 : 177-9.
- Ameille J. Pathologie respiratoire aiguë d'origine toxique. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie -Pathologie professionnelle, 1993 ; 16 : 535 H20.
- Lauwerys R. R. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Paris, Masson, 2003.

Poisons hémolytiques et poisons de l'hémoglobine

J. BELEGAUD, Laboratoire de Toxicologie, UFR de Pharmacie, Amiens.
J.-L. BENOIT-GUYOD, Laboratoire de Toxicologie, UFR de Pharmacie, Grenoble.
D. MARZIN, Laboratoire de Toxicologie, UFR de Pharmacie, Lille.

V. Mesure de la méthémoglobine

VI. Poisons hémolysants

A. Hémolyses liées à un défaut de l'hématie
B. Hémolyses par action directe
C. Mécanismes immunologiques
D. Conséquences de l'hémolyse

L'hémoglobine est une hémoprotéine porphyrique renfermant du fer qui assure chez les animaux supérieurs le transport de l'oxygène des poumons aux tissus. Les poisons de l'hémoglobine peuvent perturber son bon fonctionnement par quatre grands types de mécanismes :

- *en bloquant sa synthèse : c'est le cas des dérivés minéraux du plomb ;*
- *en se liant au fer de l'hémoglobine perturbant ainsi le transport de l'oxygène : c'est le cas de l'oxyde de carbone ;*
- *en oxydant le fer de l'hémoglobine ce qui empêche le transport convenable de l'oxygène : c'est le cas des agents méthémoglobinisants ;*
- *en libérant l'hémoglobine de l'hématie perturbant ainsi le transport de l'oxygène : c'est le cas des poisons hémolytiques.*

I. Rappels sur la structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine comprend quatre chaînes de globine et quatre molécules d'hème. La globine est une protéine oligomérique formée de quatre chaînes α peptidiques séparées : deux chaînes et deux chaînes $\beta(\alpha_2\ \beta_2)$. Chaque chaîne peptidique contient un hème de structure prophyrinique lié de façon non covalente.
La structure d'un hème, formé de quatre noyaux pyrroles, peut être représentée schématiquement comme un complexe plan et carré avec les quatre azotes porphyriques aux quatre angles. L'atome de fer divalent se situe en son centre et présente six liaisons de coordination ; quatre liaisons avec les azotes de l'hème et deux avec le groupement imidazole d'un reste histidine de la chaîne de globine. L'une de ces deux liaisons est disponible de façon réversible pour pouvoir se lier à une molécule d'oxygène.
Chaque molécule d'hémoglobine fixant quatre molécules d'oxygène sur le fer constitue l'oxyhémoglobine. La liaison de l'oxygène à l'hémoglobine se fait selon une courbe hyperbolique (saturation en O_2 fonction de la pression partielle d'oxygène) spécifique afin d'assurer efficacement la fixation de l'oxygène dans les poumons et sa libération dans les tissus. Cette liaison de l'oxygène à l'hémoglobine dépend de deux principaux phénomènes :

- le changement conformationnel des structures tertiaires des chaînes α et β de la molécule à l'état désoxygéné et une contraction à l'état oxygéné. Ces mouvements s'exercent essentiellement au niveau des liaisons 1, 2 et 2, 1. Une mutation à ce niveau modifie les propriétés de fixation et de libération de l'oxygène. L'interaction entre les sous-unités n'intervient pas dans la myoglobine ou certaines hémoglobines pathologiques qui ne possèdent qu'un seul type de chaîne. Ces molécules sont donc inaptes à fixer l'oxygène ;
- l'hémoglobine se comporte comme une enzyme allostérique vis-à-vis de l'oxygène et du 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG).

Le 2-3 DPG (issu d'une voie annexe de la glycolyse) peut se fixer au niveau de la poche centrale située entre les quatre sous-unités, entraînant une dilatation de la molécule d'hémoglobine avec libération d'oxygène. Le taux de 2-3 DPG règle ainsi l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.

II. Les dérivés minéraux du plomb

Utilisé depuis la plus haute antiquité, le plomb est devenu au fil des siècles un toxique industriel majeur et de ce fait un polluant de notre environnement. À l'état naturel on le trouve sous forme de minerai, le plus répandu étant la galène (PbS), le zinc lui étant très souvent associé.

A. Propriétés physico-chimiques

Le plomb est un métal mou, bleuâtre à gris argent. Un point de fusion bas (327 °C), une forte densité, une ductilité élevée, une inertie chimique et une aptitude à former des alliages avec d'autres métaux constituent les principales propriétés mises à profit à des fins industrielles.
Il peut être inséré au sein de dérivés organiques alcoyles (plomb tétraméthyle et tétraéthyle). Il possède également une grande affinité pour les fonctions thiols (effet thioloprive).
Les sels inorganiques sont généralement peu solubles à l'exception des nitrates et des acétates. Le plomb est en revanche soluble dans les acides dilués.

B. Étiologie des intoxications

Le plomb a des applications sans cesse plus diversifiées dans l'industrie, devenant indirectement un polluant majeur de notre environnement.
Les activités professionnelles utilisant le plomb sont nombreuses : les extractions minières, les opérations de fonte et de raffinage des minerais particulièrement polluantes, ainsi que la récupération de vieux produits manufacturés constituent les sources principales d'exposition.
L'industrie des accumulateurs et des câbles électriques, la fabrication des peintures (minium contre la corrosion et chromate comme pigment jaune) représentent des activités à risque. Les industries du bâtiment utilisent du plomb en feuille pour assurer certaines étanchéités ou isolations phoniques. Les alliages utilisés dans les opérations de soudure en contiennent des quantités non négligeables. Les blindages anti-radiations sont exclusivement à base de plomb. Il est utilisé également pour améliorer la stabilité de certaines matières plastiques (stéarate) ou comme additif de certains lubrifiants (naphténate). Les cristalleries l'utilisent pour donner éclat et transparence au verre.
Les sources non professionnelles proviennent soit de contaminations d'origine alimentaire, soit de la pollution atmosphérique. Les aliments sont généralement peu contaminés naturellement par le plomb, un très faible apport pouvant provenir des technologies mises en œuvre pour leur élaboration. Mais l'utilisation de matériel culinaire, et plus spécialement de poteries et de céramiques colorées par des émaux plombifères, peut être à l'origine de l'absorption journalière de quantités anormales de plomb. Un autre mode de contamination peut résulter de l'utilisation d'emballages métalliques notamment de boîtes de conserves « ancienne généra-

tion » comportant encore des parties soudées. La consommation régulière de vin est à l'origine d'une imprégnation non négligeable, puisque les vins ordinaires ont une teneur moyenne de 200 µg/L, ce chiffre pouvant être très largement dépassé avec certains vins vieux. La consommation d'eau « agressive » peut également se révéler nocive lorsqu'elle circule dans des canalisations en plomb, ce qui peut être observé encore dans de vieilles habitations. Par ailleurs, l'utilisation de plomb alcoyle dans les supercarburants pour empêcher le phénomène de détonation du moteur contribue dans une faible mesure à maintenir une teneur en plomb minéral dans l'air ambiant au même titre que les incinérateurs municipaux d'ordures ménagères.

C. Biodisponibilité

Deux voies de pénétration principales permettent au plomb de pénétrer dans l'organisme :

- voie digestive : environ 10 % du plomb ingéré avec les aliments et les boissons est absorbé ;
- voie pulmonaire : environ 35 % du plomb inhalé avec l'air ambiant est déposé dans les voies respiratoires, au niveau alvéolaire et dans les régions profondes de l'appareil trachéo-bronchique. Compte tenu des mécanismes d'épuration pulmonaire, il est difficile d'apprécier à sa juste valeur la fraction franchissant la membrane alvéolocapillaire. Cependant cette voie de pénétration peut être considérée comme étant la plus efficace.

Le transport du plomb absorbé s'effectue presqu'exclusivement par fixation sur l'hématie (dépôts d'agrégats ou liaisons à des protéines) la concentration érythrocytaire étant environ seize fois supérieure à la concentration plasmatique. La distribution tissulaire se répartit entre deux types de tissus :

- le squelette qui représente le site essentiel de stockage dont la concentration en plomb augmente pendant presque toute la vie, localisé dans les zones de formation osseuse active, riches en calcium. Cette fixation serait le reflet d'une exposition cumulative à long terme ;
- les tissus mous et plus particulièrement la moelle osseuse, les cellules de la lignée érythroblastique, le rein, le poumon et le SNC dont la concentration ne varie pas significativement avec l'âge, les fluides corporels et les tissus mous reflétant une exposition actuelle et récente.

Le plomb traversant facilement le placenta, l'accumulation dans le corps humain commence à la vie fœtale.

L'élimination du plomb s'effectue par deux voies principales :

- le tractus gastro-intestinal englobant la partie non absorbée après ingestion et la fraction absorbée rejetée par l'intermédiaire de la bile ;
- la voie urinaire surtout par filtration glomérulaire quantitativement plus faible et plus lente que l'excrétion intestinale et très variable pour un sujet donné. La sueur, les phanères peuvent constituer un mode d'élimination mineur.

La teneur totale en plomb de l'organisme peut atteindre 200 mg chez un homme de 50 à 70 ans non directement exposé. Il apparaît que chez un homme normal, la balance entre les entrées et les sorties de plomb est à peu près équilibrée. Les capacités

limites d'excrétion étant rapidement atteintes, en cas d'exposition anormale l'équilibre sera rompu, contribuant ainsi à augmenter la charge globale en plomb de l'organisme, justifiant le caractère cumulatif de ce métal.

D. Mécanisme d'action toxique

Le plomb localisé sur les tissus mous est responsable d'effets toxiques. La cible principale et la plus sensible est sans nul doute le système hémopoïétique. Très précoce dans ses aspects métaboliques, cette atteinte est cependant tardive dans ses conséquences cliniques et peut se manifester à plusieurs niveaux.

1. Au niveau de la biosynthèse de l'hème

Le plomb possède des propriétés thioloprives qui vont s'exercer vis-à-vis d'enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'hème et ayant dans leur centre actif des fonctions thiols Ces perturbations ont pour conséquence des concentrations anormales de précurseurs de l'hème dans le sang et l'urine.
L'action inhibitrice du plomb est certaine au niveau de deux enzymes :

- ALA déshydratase (ALA-D) : il en résulte une élévation dans les cellules de l'organisme d'acide δ amino lévulinique (ALA) éliminé par les urines ;
- ferrochelatase (hème synthétase) : entraînant une augmentation du taux des protoporphyrines dans les cellules du système érythropoïétique.

L'action inhibitrice au niveau de la coproporphyrinogène oxydase est assez discutée. Une élévation importante de l'excrétion urinaire et intestinale de coproporphyrine III chez l'homme atteint de saturnisme est bien observée, mais elle pourrait également être due au blocage partiel de la ferrochelatase. Il en est de même pour l'action sur l'hème synthétase qui selon certains serait inhibée, alors que pour d'autres la baisse de synthèse de l'hème servirait de stimulus pour augmenter le taux d'activité de cet enzyme par un rétrocontrôle (*fig. 1*).

2. Au niveau de l'érythrocyte

Un raccourcissement de la longévité des hématies (+ 100 jours) est souvent, mais non régulièrement, observé dans le cas d'anémies saturnines qui pourrait être dû à une perte de l'intégrité de la membrane, secondaire à l'inhibition de la Na^+/K^+ ATPase intervenant assez précocement.
Une inhibition de la pyrimidine 5 nucléotidase est également observée, avec pour conséquence l'accumulation puis la précipitation dans les hématies de nucléosides pyrimidiques en excès, formant les granulations basophiles toujours présentes dans les cas de saturnisme grave et prolongé.

3. Au niveau de la synthèse de la globine

La diminution de la synthèse de l'hème s'accompagne d'une baisse de synthèse de la globine dont le mécanisme est encore mal élucidé. Ces deux effets indépendants l'un de l'autre contribuent à une production diminuée d'hémoglobine représentant une des causes de l'anémie observée dans les cas cliniques de saturnisme.

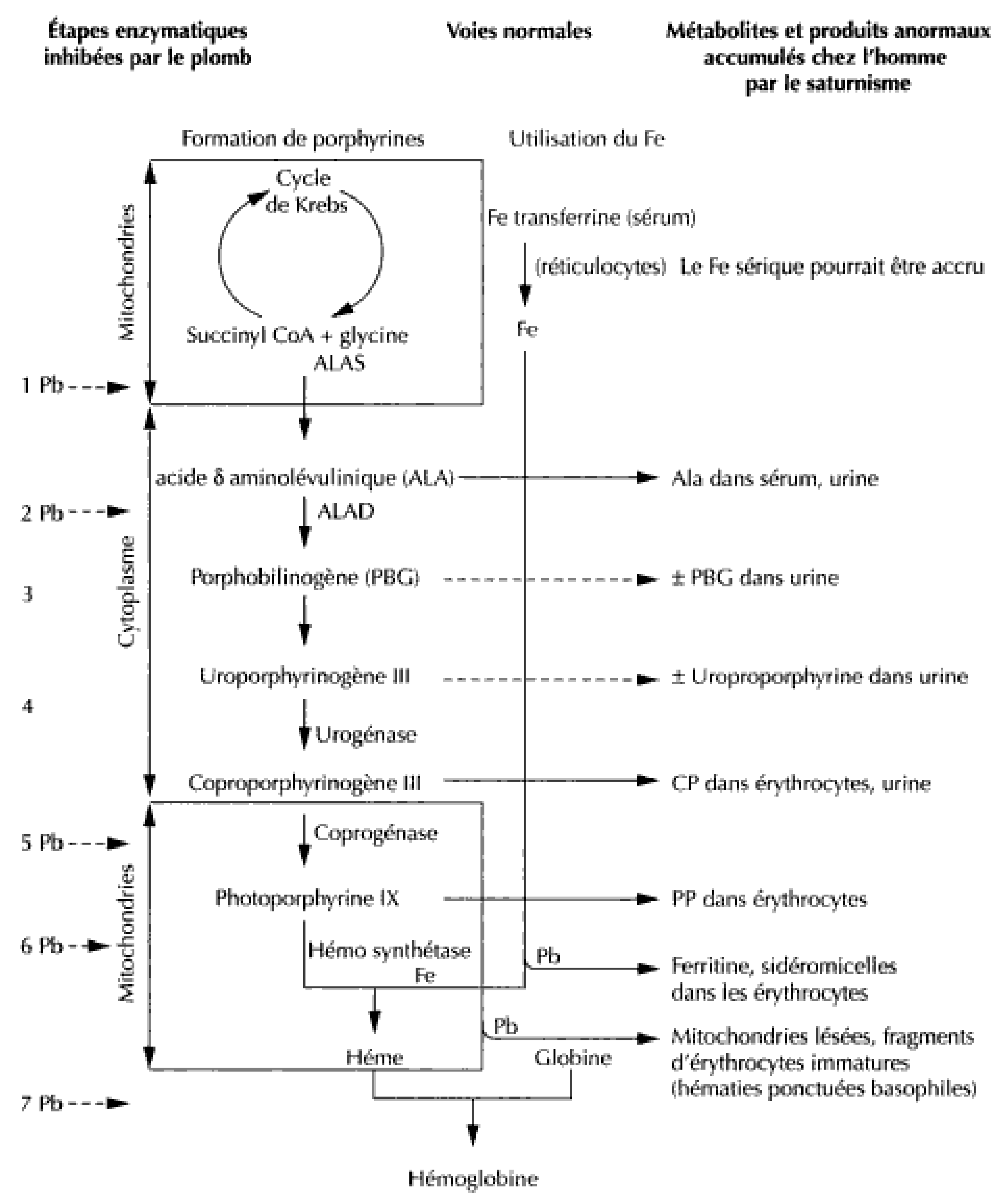


Figure 1. Schéma de la biosynthèse de l'hème. Sites d'action du plomb

E. Toxicologie clinique

La nocivité du plomb sur l'organisme est connue depuis très longtemps et la première « maladie professionnelle » reconnue fut le saturnisme en 1919.
L'intoxication aiguë par le plomb est devenue extrêmement rare et la fréquence des cas d'intoxication à long terme (saturnisme) a été considérablement diminuée ces dernières années, grâce aux effets conjugués des mesures techniques préventives et du contrôle médical exercé par la médecine du travail. Il faut de plus souligner la sensibilité plus grande de l'enfant vis-à-vis de l'imprégnation plombique.

1. Symptomatologie

a) Aiguë

Les symptômes sont plutôt non spécifiques, débutant par des troubles gastro-intestinaux avec de violentes douleurs abdominales accompagnées de coliques, de vomissements, de soif. Des troubles nerveux apparaissent progressivement, marqués par de l'agitation, des convulsions et une faiblesse musculaire évoluant en paresthésies. Le rein est également touché sous forme d'une néphrite aiguë avec hémoglobinurie. La mort intervient après un collapsus cardiovasculaire.

b) À long terme

Les symptômes sont variables selon le degré d'évolution du saturnisme. La phase de pré-saturnisme qui correspond à une période d'imprégnation silencieuse est marquée par l'absence de signes cliniques spécifiques, mais par des modifications biologiques qui doivent être décelées précocement pour empêcher toute évolution du saturnisme.

■ *Troubles hématologiques*

Une anémie hypochrome et microcytaire est fréquemment observée, résultant de la durée de vie réduite de l'hématie et des perturbations de la biosynthèse de l'hème, accompagnée d'un nombre accru de réticulocytes. Les enfants paraissent plus sensibles que les adultes à l'anémie. La basophilie ponctuée des hématies ne représente pas un indice sensible de surexposition.
Suite à l'inhibition de la ferrochelatase, les protoporphyrines IX se retrouvent en excès, prennent la place de l'hème au sein de l'hématie et en l'absence de fer, chélatent le zinc dans la circulation sanguine. La détection de ces protoporphyrines zinc (PPZ) est d'un bon diagnostic.

■ *Troubles gastro-intestinaux*

Précédée par quelques troubles de l'état général (anorexie, vomissement), la colique constitue un avertissement précoce assez régulier d'un risque d'effets plus graves. Elle est également fréquemment observée chez le jeune enfant atteint de saturnisme.

■ *Troubles nerveux*

Deux manifestations distinctes peuvent se produire :
- encéphalopathies observées surtout chez l'enfant. Les premiers signes se manifestent par de l'abêtissement, de l'irritabilité, des céphalées et des tremblements musculaires pouvant rapidement évoluer vers un delirium, des convulsions, de la paralysie et un coma. Un œdème cérébral et des dégénérescences neuronales constituent les principales lésions cérébrales ;
- neuropathies périphériques : la survenue de paralysie était autrefois fréquente chez les saturnins. Une asthénie des muscles extenseurs touchant surtout la fonction motrice, des hyperesthésies, des paralysies siégeant au niveau des doigts et des poignets sont les signes les plus fréquents. Ces atteintes sont dues à des phénomènes de démyélisation et de dégénérescence axonale.

■ *Troubles rénaux*

Deux types d'atteintes peuvent être observées :
- réversibles : une atteinte des tubes proximaux perturbe en priorité la réabsorption du glucose et des acides aminés ;

- irréversibles : une néphropathie interstitielle chronique avec atrophie glomérulaire et fibrose peut être observée sur des sujets exposés professionnellement à un très haut degré de plomb et sur une très longue durée. Le syndrome d'insuffisance rénale est fréquemment associé à l'apparition de goutte en liaison avec les concentrations sanguines élevées en acide urique dont l'excrétion urinaire est diminuée.

■ *Autres effets*

Le saturnisme abaisserait le degré de fécondité des hommes par effet toxique direct sur les gonades. Des cas d'asthénospermie ont été rapportés. De même une mortalité néonatale peut s'observer pour des expositions à des concentrations relativement élevées. Par ailleurs, le plomb pourrait également altérer le système immunitaire humoral. Chez des animaux d'expérience cette immunosuppression intervient à de faibles concentrations en plomb, avant même que ne se manifestent des signes de toxicité.

2. Traitement des intoxications

La valeur de la plombémie et l'appréciation des variations des épiphénomènes sanguins et urinaires doivent permettre de déterminer si une thérapeutique efficace doit être menée rapidement. Pour une plombémie supérieure à 100 µg %, après établissement d'une diurèse adéquate, l'administration de chélateurs type BAL, EDTA calcique ou pénicillamine isolée ou en association permet de former avec le plomb des complexes stables rapidement éliminés par voie urinaire. Cette thérapeutique doit être limitée dans le temps afin d'éviter une déplétion des réserves corporelles en métaux essentiels et particulièrement le zinc. Un traitement chélateur de courte durée est généralement associé à une augmentation rebond de la plombémie vraisemblablement due à une redistribution interne du plomb.

F. Toxicologie analytique

Afin d'apprécier l'exposition d'un sujet au plomb, il est nécessaire de procéder à son dosage dans les atmosphères et dans les milieux biologiques (sang). La recherche et le dosage d'épiphénomènes sont d'une très grande utilité soit pour confirmer le diagnostic de l'intoxication, soit comme dépistage précoce.
Dans tous les cas, il faudra accorder une attention toute particulière à la propreté des instruments et à la pureté des réactifs afin de prévenir la survenue d'artéfacts dus à une contamination secondaire par le plomb.

1. Dosage dans les atmosphères

Après aspiration, les particules sont recueillies sur des filtres en fibre de verre ou en ester de cellulose, ces derniers présentant l'avantage d'être solubles dans les acides dilués. Les particules sont solubilisées par de l'acide nitrique puis minéralisées à 300 °C. La détermination analytique est effectuée par la mise en œuvre pratiquement exclusive de méthodes physiques.
La spectrophotométrie d'absorption atomique représente la méthode de référence par sa spécificité et sa grande sensibilité surtout dans sa version d'atomisation sans flamme avec four graphite.

Les dosages peuvent également être effectués par des méthodes électrochimiques comme la voltamétrie à décapage anodique et la polarographie.

2. Dosage dans les milieux biologiques

La plomburie étant critiquable compte tenu des fluctuations importantes de l'élimination du plomb par un rein souvent lésé, le sang représente le milieu de choix pour la détermination biologique du plomb.
L'échantillon de sang subit une minéralisation nitrique puis est soumis aux techniques citées précédemment. En l'absence de ces types d'appareillage, une méthode par voie chimique (Truhaut-Boudene) peut être utilisée. Elle met en jeu la dithizone (diphénylthiocarbazone) qui donne avec les ions Pb^{2+} un complexe coloré en rose extractible par le chloroforme en milieu alcalin. Le dosage s'effectue par titrimétrie comparative après élimination d'éléments gênants susceptibles d'être rencontrés dans un minéralise, permettant une bonne spécificité.
La plombémie doit être considérée comme un bon test d'exposition donnant un reflet instantané de la surcharge saturnine. Toute valeur inférieure à 30 µg % peut être considérée comme « normale ».

3. Recherche et dosage des épiphénomènes

a) ALA urinaire

C'est un bon test de « *screening* » ayant une bonne spécificité, la seule interférence possible pouvant avoir pour origine une porphyrie aiguë. Sans être particulièrement précoce, ce test peut être rendu spécifique par le dosage du porphobilinogène qui n'est pas modifié en cas de saturnisme.
(Valeurs usuelles : < 20 mg/g créatinine).

b) Coproporphyrines urinaires

Leur élévation importante témoigne presque toujours d'un saturnisme évident, mais ce test est moins spécifique et moins sensible que l'ALA urinaire.
(Valeurs usuelles : < 100 µg/g créatinine).

c) Test de l'hyperplomburie provoquée

De bonne valeur diagnostique, ce test est pratiqué en injectant de l'EDTA calcique. Sur le recueil des urines des 5 premières heures suivant la perfusion puis sur celles des 19 heures suivantes, la plomburie est déterminée : toute valeur supérieure à 300 µg/L permet d'affirmer le saturnisme. Il est le reflet de la fraction active de la charge saturnine corporelle.

d) Protoporphyrines érythrocytaires

C'est un test très précoce étroitement corrélé avec le taux de plombémie qui, contrairement aux dosages précédents (ALA et coproporphyrines urinaires), ne reprend une valeur normale que lorsque la moelle osseuse est totalement débarrassée du plomb accumulé. Pouvant être également augmentées dans les cas d'anémie, des élévations franches sont pratiquement toujours liées au saturnisme.
(Valeurs usuelles : < 20 µg/g d'Hb).

e) Activité ALA-D érythrocytaire

Les très grandes sensibilité et précocité d'inhibition de cet enzyme, déjà observées pour des teneurs en plomb « physiologiques », rendent ce test pratiquement ininterprétable en cas de saturnisme naissant.

f) Recherche des hématies à granulations basophiles (HGB)

Elle ne permet qu'une confirmation d'un saturnisme, son manque de sensibilité ne lui permettant pas une détection précoce.

G. Prévention

La fréquence du saturnisme en France a été diminuée grâce à l'application de mesures préventives efficaces.

1. Au niveau industriel

L'évacuation des poussières, le port de gants et de vêtements protecteurs, l'interdiction de nourriture et de boissons sur le lieu de travail constituent les principales mesures. Les contrôles atmosphériques pratiqués périodiquement ne doivent pas laisser apparaître de concentrations supérieures à 150 $\mu g/m^3$, valeur moyenne sur 40 heures.
Le saturnisme est reconnu comme maladie professionnelle (1er tableau). Un contrôle de la plombémie et d'autres paramètres biologiques (ALA-U et PPZ) doit être effectué avec une périodicité qui dépend du degré d'exposition.

2. Au niveau de l'environnement

L'interdiction de l'emploi du carbonate (céruse) et du sulfate de plomb dans les peintures blanches destinées au bâtiment a permis de prévenir les cas d'encéphalopathies chez les jeunes enfants vivant dans des habitations vétustes. L'obligation du pot catalytique depuis 1993 sur les véhicules à essence interdit l'utilisation des carburants plombés. Pour les véhicules non catalysés, la suppression du plomb tétraéthyle dans les carburants sera effective à compter du 1er janvier 2000.

III. Oxyde de carbone

Formé lors de la combustion incomplète de toute matière carbonée, l'oxyde de carbone est responsable de fréquentes intoxications aiguës, très souvent de gravité immédiate. Mais il peut également, lors d'expositions répétées à faibles doses, jouer un rôle dans la genèse de certaines pathologies.

A. Propriétés physico-chimiques

L'oxyde de carbone est un gaz incolore, inodore et insipide, ce qui explique le caractère insidieux des intoxications. De densité proche de celle de l'air (0,97), c'est un gaz très diffusible. Pratiquement insoluble dans l'eau, il est très difficilement liquéfiable

et n'est pas absorbé sur charbon actif. Son aptitude à absorber les rayonnements infrarouge a été mis à profit pour la mise au point d'appareils de détection atmosphérique. Ses propriétés réductrices sont utilisées vis-à-vis de certains sels métalliques dans les méthodes de dosage par voie chimique dont la réduction modifie la couleur initiale permettant ainsi une mise en évidence aisée dans les atmosphères.

B. Mode de formation

1. Origine chimique

La combustion incomplète du carbone produit de l'oxyde de carbone selon la réaction :

$$C + 1/2\ O_2 \rightarrow CO$$

Le carbone incandescent au contact de CO_2 peut également dégager ce gaz :

$$C + CO_2 \rightarrow 2CO$$

2. Origine naturelle

Les sources naturelles sont quantitativement les plus importantes mais leur caractère diffus et une bonne répartition sur la surface du globe minimisent leur impact. Elles sont surtout représentées par la photodissociation du CO_2, en haute altitude et par le gaz des volcans. Il est également possible que la dégradation photochimiques de dérivés organiques comme le méthane (gaz des marais) ou de certains hydrocarbures aliphatiques entretienne de faibles teneurs d'oxyde de carbone dans l'atmosphère.

Les sources biologiques ont en revanche une incidence plus directe sur l'organisme. Loeper puis Sjostrand montrèrent que l'oxyde de carbone pouvait être produit par l'organisme de tout mammifère, constatant que l'air expiré d'animaux placés en cage fermée contenait du CO, alors que l'air qu'ils respiraient n'en contenait pas. Cette production endogène a pour origine le catabolisme des protéines héminiques (catalase et cytochromes) et surtout de l'hème, qui lors de l'ouverture du noyau tétrapyrrolique de l'hémoglobine pour former la bilirubine, libère un atome de carbone à partir d'un pont méthène dont l'oxydation aboutit à la formation de CO (*fig. 2*).

protoporphyrine → C*O + bilirubine

Figure 2. Mécanisme physiologique de la production endogène de CO

La quantité générée est équimolaire par rapport au pigment biliaire produit. Selon Coburn, cette production représenterait environ 0,4 mL de CO par heure. Il en résulte de ce fait la présence d'un taux biologique normal de CO dans le sang de tout mammifère. De plus, illustrant ce phénomène biologique, les sujets atteints de maladies hémolytiques (anémie, thalassémie, maladie rhésus…) présentent un taux anormalement élevé de CO dans le sang. Par ailleurs, une production indirecte de CO peut également avoir lieu dans l'organisme lors du métabolisme de certains solvants dihalogénés dérivés du méthane (dichlorométhane, dibromométhane).

C. Étiologie des intoxications

1. Origine industrielle

Deux types d'activités industrielles sont particulièrement exposées au risque de production massive de CO :

- l'industrie des charbonnages lors des incendies de mine (coup de grisou et coup de poussières) se produisant dans les espaces restreints que constituent les galeries de mine ;
- l'industrie des métaux ferreux et non ferreux, lors des opérations de fusion, de frittage des minerais ou dans les aciéries où les gaz s'échappent au-dessus de l'acier en fusion peuvent avoir des teneurs de l'ordre de 30 % en oxyde de carbone.

De nombreuses autres industries sont également concernées, plus particulièrement les industries chimiques et les raffineries de pétrole au cours des opérations de craquage.

2. Origine domestique

Les chauffages utilisant le gaz ou le charbon représentent les causes les plus fréquentes et les plus graves des intoxications souvent mortelles.

Les poêles à charbon vétustes, installés dans des conditions défectueuses (tirage insuffisant, cheminée mal entretenue) réalisent les conditions idéales d'une combustion incomplète. Mais il ne faut pas négliger la possibilité de certains poêles à tirage excellent de réduire en CO le gaz carbonique au contact du charbon incandescent. C'est pour cette raison que les braseros ne doivent pas être utilisés dans un local fermé mais seulement en plein air.

Le gaz naturel (méthane) ou d'autres hydrocarbures aliphatiques (propane, butane) peuvent également être à l'origine des mêmes nuisances lorsqu'ils sont utilisés dans de mauvaises conditions d'aération. Par exemple, la combustion d'un chauffe-eau « instantané » non raccordé à un conduit de fumée, ou dont la gaine d'évacuation est défectueuse, fonctionnant en atmosphère confinée ou saturée de vapeur d'eau, est génératrice de CO selon la réaction :

$$CH_4 + 3/2\ O_2 \rightarrow CO + 2H_2O$$

Une autre source très importante est représentée par les gaz d'échappement des moteurs à essence tournant au ralenti, qui, en cas de mauvais réglage, peuvent avoir des teneurs de l'ordre de 7 à 10 % en CO dans des conditions critiques d'utilisation. Il est à noter qu'un moteur diesel bien réglé est moins polluant en ce cas qu'un moteur à essence.

Enfin l'usage du tabac ne doit pas être oublié, puisque la combustion d'une seule cigarette peut dégager jusqu'à 25 mL de CO, le chiffre étant encore plus élevé dans le cas du cigare. Les taux sanguins les plus importants sont observés chez les fumeurs inhalant la fumée. Il ne faut pas non plus négliger le cas du « fumeur passif », sujet non fumeur qui passe un certain temps dans une enceinte riche en fumée de tabac, dont le taux sanguin en CO peut augmenter de manière très significative. Tous les auteurs admettent que le risque résultant de l'inhalation de fumée de cigarette est très nettement supérieur à celui encouru par l'absorption de CO atmosphérique dans des conditions normales.

D. Biodisponibilité

Les apports exogènes d'oxyde de carbone ne peuvent provenir que de l'air inhalé pollué. En raison de sa très faible hydrosolubilité il parvient très rapidement à l'alvéole, diffuse à travers la membrane alvéolo capillaire et se fixe sur l'hème de l'hémoglobine. Les autres apports sont d'origine endogène résultant du catabolisme des protéines héminiques.

La carboxyhémoglobine (HbCO) ainsi formée est stable. La fixation est rapide d'allure hyperbolique pour atteindre un équilibre qui ne sera pas dépassé quelle que soit la durée du séjour dans l'atmosphère toxique. La réaction de fixation étant réversible, le palier dépend essentiellement de deux paramètres : la concentration de l'air alvéolaire en CO et la durée d'exposition. Il ne peut en aucun cas dépasser les 2/3 de saturation du pigment (*fig. 3*).

En revanche, la décroissance du taux de HbCO s'effectue de manière linéaire, dépendant étroitement de la quantité d'oxygène disponible.

L'hémoglobine, bien qu'étant le site de fixation majeur (environ 85 %) du CO, ne représente pas le seul, puisque d'autres molécules biologiques à structure héminique peuvent jouer également ce rôle. Il en est ainsi de la myoglobine qui par sa localisation intracellulaire peut être considérée comme une possibilité de forme de stockage du

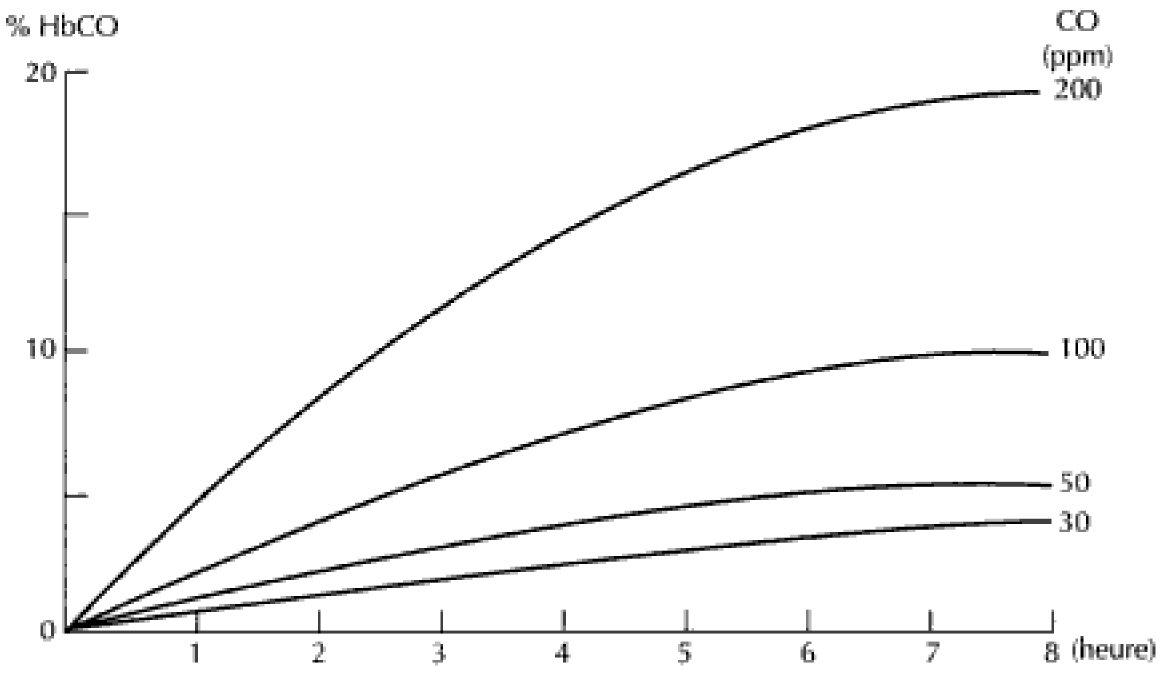


Figure 3. Courbes de formation de HbCO en fonction de différentes concentrations de CO

CO pour des expositions de longue durée. D'autres pigments héminiques comme les cytochromes et les hydroperoxydases peuvent également fixer ce gaz perdant de ce fait leur capacité fonctionnelle. Il convient également de signaler que le CO traverse facilement le placenta, le fœtus se trouvant ainsi directement exposé.
L'élimination se fait essentiellement par le rejet dans l'air expiré à condition que la pression partielle sanguine du CO soit supérieure à celle de l'air alvéolaire. Une quantité très faible peut être métabolisée en gaz carbonique. La demi-vie biologique du CO chez l'adulte sédentaire est de l'ordre de 4 à 5 heures (*fig. 4*).

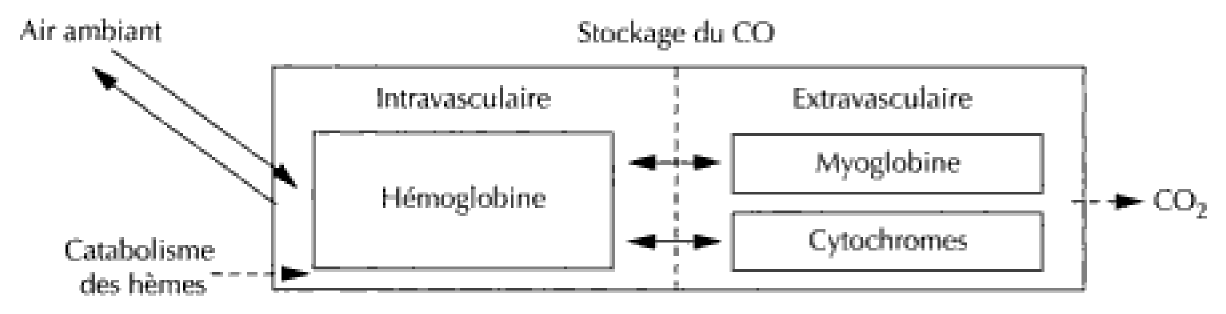


Figure 4. Biodisponibilité du CO dans l'organisme (d'après Coburn)

E. Mécanisme d'action toxique

La toxicité de l'oxyde de carbone résulte des conséquences de sa fixation sur les hémoprotéines dont il entrave le rôle biologique.

1. Action au niveau de l'hémoglobine

L'oxyde de carbone forme avec l'hémoglobine la carboxyhémoglobine :

$$HbO_2 + CO \rightleftharpoons HbCO + O_2$$

a) 1er point

La combinaison est stable.
Une compétition s'exerce entre le CO et l'oxygène pour un même site héminique, le CO se fixant par des ligands entre le fer de l'hème et l'azote de la molécule d'histidine la plus proche de la globine (*fig. 5*).

Figure 5. Mode de fixation du CO sur la molécule d'hémoglobine

b) 2e point

La combinaison est réversible.
La réaction d'équilibre est régie par la loi d'action de masse : la constante d'équilibre M exprime l'affinité relative de l'hémoglobine pour le CO. Elle varie selon l'espace et le sujet exposé. Sa valeur est voisine de 210 chez l'homme, ce qui signifie que l'affinité de l'hémoglobine humaine pour le CO est 210 fois plus élevée que pour l'oxygène. L'affinité de l'hémoglobine fœtale vis-à-vis du CO est supérieure à celle du sang maternel avec des conséquences importantes pour le fœtus.
La réversibilité de la réaction est mise à profit dans les méthodes de thérapeutique d'urgence.

c) 3e point

L'oxygénation tissulaire est modifiée.
L'observation de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine en présence de carboxyhémoglobine montre un déplacement vers la gauche, ce qui signifie que la liaison d'une ou plusieurs molécules de CO à une molécule d'hémoglobine avec ses quatre groupements héminiques prosthétiques augmente l'affinité des trois groupements restant vis-à-vis de l'oxygène.
En conséquence, en raison d'une pression d'oxygène gazeux très diminuée par rapport à la normale, le relargage périphérique de l'oxygène vers les tissus est diminué, aggravant l'hypoxie initiale. Une quantité réduite d'oxygène transporté, associée à une mauvaise libération dans les capillaires contribue à créer un état d'hypoxie tissulaire. De ce fait, des organes gros consommateurs d'oxygène comme le système nerveux central (SNC) et le myocarde seront particulièrement vulnérables à cette action. Cela explique d'ailleurs la grande sensibilité au CO des personnes âgées en raison de la diminution de leur circulation cérébrale et myocardique (*fig. 6*).

2. Action au niveau de la myoglobine

Pour les mêmes raisons, la fixation d'oxyde de carbone sur cette protéine musculaire qui joue un rôle dans le stockage de l'oxygène au niveau du muscle en facilitant la diffusion de ce dernier à travers le cytoplasme, affectera l'oxygénation de certaines cellules musculaires et tout particulièrement le myocarde, l'affinité pour le CO étant cependant inférieure à celle de l'hémoglobine mais l'élimination beaucoup plus lente.

3. Action au niveau des autres protéines héminiques

La fixation de CO sur ce type de molécules contribue à inhiber plus ou moins partiellement leurs fonctions biologiques. Or, le rôle des cytochromes au niveau de la mitochondrie est essentiel dans le mécanisme de la respiration cellulaire, ce qui aggravera encore le risque d'hypoxie cellulaire. De plus le CO ayant une affinité toute particulière pour le cytochrome P-450 qui intervient dans la plupart des processus d'oxydation cellulaire, des modifications possibles du métabolisme d'autres molécules biologiques (endogènes) médicamenteuses ou toxiques (exogènes) sont prévisibles, aboutissant selon les cas à un renforcement d'activité ou au contraire à une inactivation.

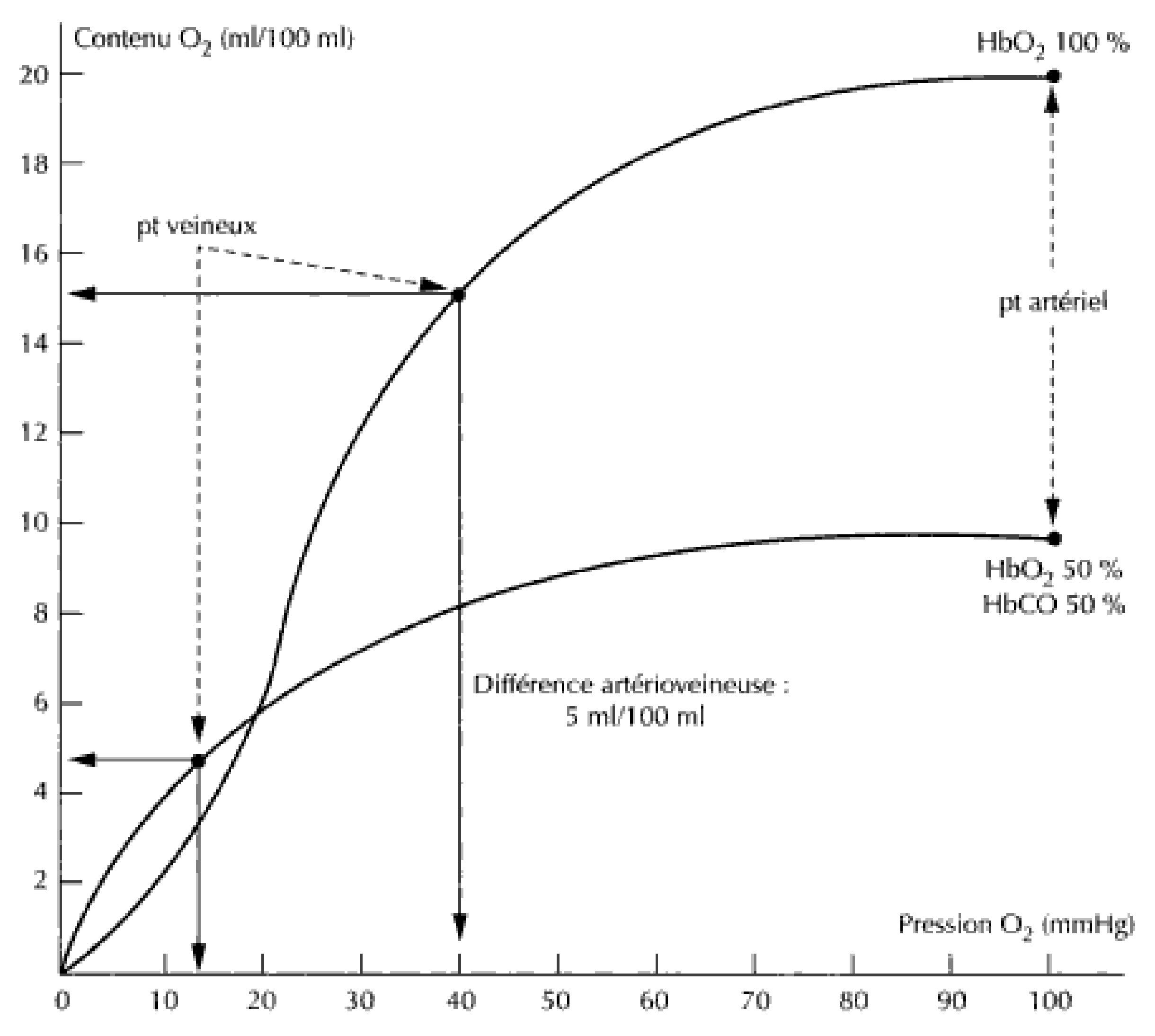


Figure 6. Courbes de dissociation de HbO_2. Influence de la présence de 50 % de HbCO sur le contenu et la pression en oxygène

F. Toxicologie clinique

1. Symptomatologie

a) Aiguë

Les effets cliniques sont caractérisés par une très grande variabilité des symptômes et se manifestent pour des taux de HbCO supérieurs à 30 %, pouvant être rencontrés dans le cas d'accidents du travail ou domestiques.

■ *Signes prémonitoires*

Ils apparaissent généralement sous forme d'une violente céphalée avec battements temporaux accompagnée d'asthénie et de vertiges. Des vomissements sans diarrhée peuvent se produire précocement. Des troubles de l'humeur (angoisse, agitation) et comportementaux (syndrome confusionnel) sont très fréquents.

■ *Signes neurologiques*

Ils résultent essentiellement de l'atteinte des systèmes pyramidaux et surtout extrapyramidaux et sont caractérisés par des myoclonies, hypertonies, troubles de l'équilibre, suivis d'une phase d'impotence musculaire de plus en plus marquée,

débutant par les membres inférieurs, le tout pouvant évoluer vers un stade comateux. Le coma oxycarboné est hypotonique avec quelques épisodes d'agitation. Il est de profondeur variable ; un coma très profond n'exclut pas une guérison sans séquelles si un traitement d'urgence efficace est pratiqué dans de brefs délais. Le faciès est cyanosé, une teinte rosée des téguments étant parfois observée avec présence de phlyctènes ou de nécrose cutanée aux points de pression.

■ *Signes cardiovasculaires*

L'examen du tracé électrocardiographique laisse apparaître des troubles de la repolarisation de type ischémique s'ajoutant à l'hypoxie myocardique. Les complications à redouter sont représentées par des troubles du rythme assez rares mais surtout une tendance au collapsus. Parfois un œdème aigu du poumon dont l'origine est mal précisée, d'apparition précoce, peut représenter un facteur de gravité considérable.

■ *Signes biologiques*

Une acidose métabolique pouvant abaisser le pH sanguin en dessous de 7,20 est toujours de mauvais pronostic. Une forte élévation de la CPK traduisant la souffrance myocardique ainsi qu'une élévation des transaminases sont fréquentes. L'examen anatomopathologique révèle une coloration rosée des différents tissus, un aspect œdémateux des poumons, des foyers de nécrose myocardique et des lésions nerveuses au niveau du pallidum.
En cas de récupération du sujet, des manifestations retardées sont fréquentes surtout chez les personnes âgées et en cas d'intoxication prolongée. Le système cardiovasculaire (infarctus, altérations persistantes de l'électrocardiogramme…) et le système nerveux (syndrome parkinsonien, mouvements choréoathétosiques, états confusionnels pseudo-démentiels, polynévrites) sont particulièrement vulnérables.

b) À long terme

Ce sont les tissus les plus irrigués donc gros consommateurs d'oxygène qui seront les plus touchés. Les syndromes observés le seront surtout en médecine du travail et chez les sujets pratiquant abondamment l'usage du tabac.

■ *Système nerveux central*

De nombreux travaux ont tenté de mettre en évidence des perturbations tant motrices que sensorielles pour de faibles teneurs en HbCO. Malheureusement, en raison de méthodologies très nombreuses et différentes selon les auteurs, les résultats obtenus peuvent paraître parfois contradictoires et difficilement comparables. Néanmoins, il ressort de ces études que des manifestations sensorielles telles que des perturbations dans la discrimination de petites différences d'intensité lumineuse peuvent être décelées pour des teneurs de 2 à 4 % d'HbCO ; de même, l'estimation de la durée de signaux auditifs peut être modifiée, pour des teneurs de 5 % d'HbCO. Une diminution de la coordination manuelle chez des volontaires a été prouvée pour des taux de 15 à 20 %.

■ *Système cardiovasculaire*

Ce sont des expérimentations animales qui ont montré que la présence de HbCO à un taux modéré (environ 15 %) favorisait la fixation de cholestérol sur la tunique interne des artères, contribuant ainsi au développement d'athérosclérose. Parallèlement, une baisse de la clairance des lipoprotéines est observée. Une élévation du

volume plasmatique et de sa teneur en protéines est fréquemment visible. Les fonctions de l'hémostase se trouvent également perturbées avec un sang ayant un taux de formation du caillot élevé.
Pour toutes ces raisons, on peut donc envisager que la présence de HbCO représente un facteur favorisant la maladie athéromateuse et l'infarctus du myocarde, ce que confirment de manière significative toutes les enquêtes menées chez les sujets fumeurs.
Dans le cadre des effets insidieux du CO, il faut souligner également le rôle néfaste qu'il peut exercer sur le fœtus de mères habituées au tabac. Toutes les études laissent entrevoir un abaissement du poids de naissance (150 à 325 g) ainsi qu'une certaine fragilité par rapport à ceux non exposés pouvant être attribués à la sévère hypoxie subie par certains tissus vitaux durant leur phase de développement.

2. Traitement des intoxications

La réaction de formation de HbCO est réversible. Il va donc falloir nécessairement renverser l'hypoxie myocardique et cérébrale par l'administration massive d'oxygène dans les limites de sa toxicité.

a) Intervention immédiate

Il est urgent de soustraire le malade de l'atmosphère toxique après s'être soi-même protégé par le port d'un masque à cartouche spécifique de l'oxyde de carbone. Après avoir dégagé au mieux les voies aériennes, l'oxygénothérapie ou la respiration artificielle peuvent être pratiquées pendant le transport, l'oxygène étant alors administré sous pression normobare par sonde nasopharyngée ou par masque à raison de 6 à 10 L/min. L'administration d'oxygène à 100 % ramène à 80 minutes le temps d'élimination de la moitié du CO présent sous forme de HbCO. Dans les formes sévères, l'oxygénothérapie hyperbare sous deux atmosphères par séances d'une heure renouvelables en caisson mobile, permet de pallier l'inefficacité fonctionnelle de l'hémoglobine. Cette technique augmente de manière importante la solubilité de l'oxygène dans le plasma et se révèle être d'une très grande efficacité à condition d'être précoce, sans toutefois mésestimer les risques de convulsions possibles dus à l'hyperoxie. Dans ces conditions le temps d'élimination de la moitié du CO est réduit à moins de 30 minutes. Elle doit être poursuivie tant que persistent des signes cliniques même si le sang est dépourvu de CO. Conjointement une surveillance étroite du système cardiovasculaire doit être pratiquée pour éviter la survenue d'OAP et de collapsus. Il est parfois nécessaire de traiter l'acidose métabolique ou l'œdème cérébral pouvant résulter de l'hypoxie.

b) Thérapeutique complémentaire

L'administration de corticoïdes, de diurétiques, une réhydratation hydroélectrolytique et nutritionnelle par voie veineuse, une antibiothérapie permettront de favoriser le retour à un état normal de l'intoxiqué.

G. Toxicologie analytique

Le dosage de l'oxyde de carbone revêt une grande importance soit à titre préventif, soit à des fins thérapeutiques ou diagnostiques. Il pourra être pratiqué dans les atmosphères, dans le sang ou dans l'air expiré.

1. Dosage dans les atmosphères

Les méthodes physiques reposent sur la propriété du CO d'absorber sélectivement radiations du spectre infrarouge dans une zone de longueur d'onde proche de 4 600 nm. Divers types d'appareils ont été construits sur ce principe. Très schématiquement, leur fonctionnement est le suivant : une source infrarouge émet un rayonnement qui est, grâce à un réflecteur tournant, soit obturé, soit réfléchi alternativement par deux miroirs qui le renvoient tantôt vers une cellule de référence contenant un gaz ne renfermant pas de CO, tantôt vers une cellule de mesure dans laquelle circule le mélange gazeux à analyser. Le rayonnement pénètre ensuite dans un récepteur sélectif constitué de deux cuves remplies de CO pur et séparées par un condensateur à membrane sensible aux variations de pression. Le pouvoir calorifique du rayonnement va dilater le CO de la cuve de mesure, entraînant une augmentation de sa pression interne mesurée par le condensateur et transformée en un signal électrique. Si l'échantillon à analyser contient du CO, une absorption partielle du rayonnement, proportionnelle à la quantité présente, se produit au niveau de la cellule de mesure. En conséquence, la masse de la cuve de mesure est donc chauffée différemment selon qu'elle reçoit le rayonnement qui a traversé la cellule de mesure ou celui sortant de la cellule de référence et de ce fait, l'élévation de pression mesurée diffère.
Des méthodes électrochimiques, fondées sur l'utilisation de capteurs à pile dont la tension varie selon la teneur en CO, permettent également d'effectuer des mesures, mais elles sont moins spécifiques et moins sensibles que les précédentes. Ces appareils permettent des dosages atmosphériques en continu et l'enregistreur peut être équipé d'un système d'alarme se déclenchant à partir d'une concentration seuil déterminée à l'avance.

2. Dosage dans le sang

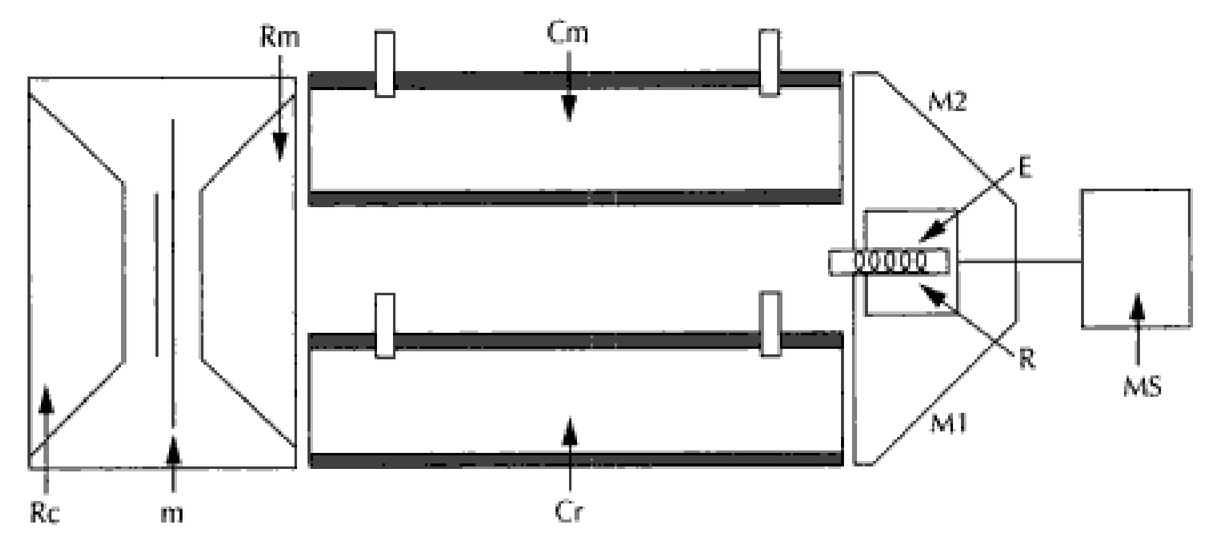
Deux groupes de méthodes de dosage peuvent être pratiqués.

a) Méthodes fondées sur le dosage du CO après dénaturation de HbCO

Le résultat est alors exprimé en mL de CO pour 100 mL de sang.
De très nombreuses méthodes ont été proposées.

■ *Méthode de Boudène*

Très utile en toxicologie d'urgence, cette méthode présente de nombreux avantages : simplicité, rapidité (1 h à 1 h 30) et mise en route simultanée de séries de dosage. La prise d'essai de sang (0,2 à 0,3 mL) est introduite dans une ampoule de verre à doubles robinets rodés à l'intérieur de laquelle un vide a été établi. Un réactif hémolysant à base de saponine permettant une hémolyse complète du sang est introduit ainsi qu'un réactif hématinisant à base de ferricyanure de potassium. La libération du CO à l'intérieur de l'ampoule est ainsi obtenue à froid. Après un temps de contact approximatif de 1 h 30, l'excès de phase aqueuse est éliminé et l'ampoule est insérée dans un circuit d'entraînement par flux d'azote balayant un analyseur infrarouge. Un étalonnage préalable de l'appareil avec des quantités variables de CO pur permet un dosage précis.



MS : moteur ; R : réflecteur tournant ; E : émetteur IR ; M1, M2 : miroirs ; Cm : cellule de mesure ; Cr : cellule de référence ; Rm : cuve de mesure du récepteur ; Rc : cuve de compensation du récepteur ; m : condensateur à membrane.

Schéma de l'analyseur infrarouge (modèle Cosma)

■ *Méthodes par microdiffusion*

Elles présentent l'avantage d'utiliser un matériel peu onéreux mais dont l'inconvénient est d'être longues et de ce fait, inutilisables en toxicologie d'urgence. L'extraction du CO se réalise à froid dans un tube rodé étanche, le sang étant déposé sur une lame en verre fritté préalablement imprégnée d'un réactif dénaturant la HbCO (méthode de Truhaut Boudène). Le CO libéré est capté par réaction avec du chlorure de palladium qu'il réduit :

$$CO + PdCl_2 + H_2O\ CO_2 + 2\ HCl + Pd^\circ$$

Après totale libération du CO (environ 12 heures), le palladium réduit est dosé par une méthode colorimétrique.

Afin de pouvoir convertir le résultat en % de HbCO, ces méthodes nécessitent le dosage de l'hémoglobine. L'application d'une formule permet la conversion : un tétramère d'hémoglobine de poids moléculaire 64 500 fixe 4 fois 22,4 L de CO.

b) Méthodes fondées sur l'évaluation directe du pourcentage de HbCO

Le résultat est alors exprimé en % de HbCO.

Ce sont des méthodes très rapides ne nécessitant que quelques gouttes de sang très simples mais dont la sensibilité et la reproductibilité sont très aléatoires pour de faibles concentrations.

Le principe de ces méthodes repose sur la dissociation des caractéristiques spectrales des différentes hémoglobines. L'oxyhémoglobine présente deux bandes d'absorption dans le visible (576 et 540 nm) qui, après action d'un réducteur, sont réduites en une seule bande (bande de Stockes) absorbant à 556 nm. En revanche, l'HbCO présente également deux bandes d'absorption dont le maximum est légèrement décalé (570 et 538 nm) mais non modifiées sous l'effet d'un réducteur. Certaines nécessitent des lectures à plusieurs longueurs d'onde, d'autres utilisent une mesure spectrophotométrique différentielle (méthode de Commins), une automatisation des lectures ayant parfois été réalisée (CO-Oximètres).

L'interprétation des résultats doit tenir compte de l'oxycarbonémie physiologique et de l'importance de la pratique du tabac.

- pour un sujet non fumeur, le seuil limite peut être évalué de 0,2 à 0,4 mL de CO/100 mL de sang soit environ 1 à 2 % de HbCO ;
- pour un sujet fumeur, le seuil extrême se situe à 1,5 mL de CO/100 mL, soit environ 7 % de HbCO ;
- pour un sujet comateux, la teneur en HbCO approche les 60 % alors que la mort survient lorsque les 2/3 de l'hémoglobine sont transformés en HbCO.

Un résultat d'oxycarbonémie est sans rapport avec la gravité de l'intoxication lorsqu'une oxygénothérapie a été pratiquée préalablement au prélèvement sanguin.
Les sujets à risque particulièrement exposés professionnellement se rencontrent parmi les fondeurs en métallurgie, les agents de police chargés de la circulation, les chauffeurs de taxi et les gardiens de parcs automobiles souterrains pour lesquels la surveillance biologique doit être renforcée.

3. Dosage dans l'air expiré

Le dosage dans l'air expiré évite le prélèvement sanguin et à condition de ne pas diluer l'air alvéolaire par de l'air bronchique au moment de son recueil, en pratiquant la méthode de la « respiration retenue », le dosage du CO effectué directement par spectrométrie dans l'infrarouge permet d'avoir une bonne corrélation avec la concentration sanguine à condition d'utiliser un sac de prélèvement parfaitement étanche (sac en saran).
La formule de Ringold permet la conversion du résultat en % de HbCO.

H. Prévention

En raison de l'absence de spécificité des signes cliniques, les mesures de prévention devront s'avérer très énergiques.

1. Mesures techniques

Le contrôle des sources d'émission et des atmosphères devra être pratiqué chaque fois que sera suspectée la présence de CO. Les méthodes fondées sur le dosage par spectrométrie infrarouge ou par électrochimie permettent des mesures en continu avec dispositif d'alarme si nécessaire. Des mesures semi-quantitatives peuvent être effectuées ponctuellement par l'appareil Draeger équipé de tubes réactifs laissant développer une coloration au contact de CO. Rappelons que la concentration limite tolérable du CO est de 50 ppm (55 mg/m^3) pour une exposition professionnelle et qu'il s'agit d'une valeur moyenne intégrée dans le temps.
La protection individuelle se fera par le port de masque équipé d'une cartouche spéciale à base d'hopcalite, capable de catalyser à température ordinaire l'oxydation du CO par l'air avec formation de CO_2 puisqu'il n'est pas absorbé sur charbon actif.

2. Mesures réglementaires

L'intoxication oxycarbonée est reconnue comme maladie professionnelle (64e tableau).
De même, dans le cadre de la lutte contre la pollution atmosphérique, un taux limite en CO des gaz d'échappement de moteurs a été fixé :

• moteur à essence = (contrôle technique)

Mise en circulation	Teneur en CO corrigée	Teneur en CO lue directement	
		Ralenti	Ralenti accéléré
Avant 1986	> 4,5 %		
1986 à 1992	> 3,5 %		
Depuis 1994		> 0,5 %	> 0,3 %

• normes d'homologation constructeur (véhicules catalysés) :
  – essence (à partir de 1994) : 2,2 g/km ;
  – diesel (à partir de 1997) : 1,0 g/km.

IV. Les méthémoglobinisants

La méthémoglobine résulte de l'oxydation du fer de l'hémoglobine par un agent oxydant.

A. Rappel sur la structure de la méthémoglobine

La méthémoglobine est une hémoprotéine formée de quatre sous-unités de poids moléculaire 16 500. Chaque sous-unité est formée comme pour l'hémoglobine :
• d'un groupement prosthétique : l'hématine, qui est formée d'un cycle tétrapyrrolique contenant un atome de fer mais sous forme trivalente ;
• d'une chaîne protéique : la globine.
La différence par rapport à l'hémoglobine tient donc dans l'état d'oxydation du fer de l'hémoglobine.

1. Dans l'hémoglobine

Le fer est divalent et présente six liaisons de coordinations :
• quatre liaisons avec les azotes du cycle tétrapyrrolique ;
• une liaison avec un azote d'une histidine de la globine ;
• une liaison avec une molécule d'oxygène.

2. Dans la méthémoglobine

Le fer est trivalent et présente également six liaisons de coordination, mais la sixième se fait avec une molécule d'eau rendant impossible la liaison avec l'oxygène.
In vivo, le fer de l'hémoglobine n'est que partiellement oxydé, on a ainsi un mélange de $(\alpha^{3+}\ \beta^{3+})_2$ et de $(\alpha^{3+}\ \beta^{2+})_2$. En effet, la forme $(\alpha^{3+}\ \beta^{3+})_2$ qui correspond à l'oxydation maximum ne peut être obtenue qu'*in vitro* par un excès d'oxydant et serait fatale *in vivo*.
Quand la méthémoglobine est libre dans le plasma à la suite d'une hémolyse, elle perd facilement son hème qui se fixe sur l'albumine pour donner de la méthémalbumine qui donne une coloration noire au plasma.

B. Propriétés de la méthémoglobine

1. Caractéristiques spectrales

La méthémoglobine présente deux maximums d'absorption : 500 et 632 nm, alors que l'oxyhémoglobine présente deux autres maximums à 540 et 570 nm.

2. Réactivité

Le fer trivalent de la méthémoglobine réagit avec les ions cyanures pour donner de la méthémoglobine qui présente un maximum d'absorption à 541 nm.

C. Métabolisme de la méthémoglobine

Les taux normaux de la méthémoglobinémie sont de :
- 0,5 % à 0,8 % chez l'adulte ;
- 1,5 % chez le nouveau-né ;
- 2 % chez le prématuré.

1. Formation

a) Physiologique

Le mécanisme est mal connu. Le métabolisme général normal conduit à la synthèse d'oxydants en particulier d'eau oxygénée.

b) Dans les intoxications

La formation de la méthémoglobine résulte de l'action de trois types d'oxydants.

■ *Les oxydants stœchiométriques*

La quantité de méthémoglobine formée est directement proportionnelle à la quantité d'oxydants : c'est le cas du ferricyanure de potassium.

■ *Les oxydants autocatalytiques*

La méthémoglobine catalyse sa propre formation : c'est le cas des chlorates.

■ *Les oxydants catalytiques*

Il existe plus de molécules de méthémoglobine formées que de molécules de toxique administré ; dans ce cas, après avoir été réduit au cours de la réaction d'oxydation de l'hémoglobine, le toxique ou son métabolite est régénéré par oxydation et peut réagir à nouveau sur une nouvelle molécule d'hémoglobine : c'est le cas de la phénylhydroxylamine.

2. Réduction de la méthémoglobine

Il existe quatre voies de réduction de la méthémoglobine.

a) Voie NADH, H^+ dépendante (*fig. 7*)

- c'est la voie principale de métabolisation de la méthémoglobine formée par voie physiologique : elle réduit au moins 60 % de la méthémoglobine ;

- elle est liée à la glycolyse anaérobie (voie d'Embden-Meyeroff) ;
- l'enzyme est la méthémoglobine réductase (diaphorase I) ;
- le cofacteur est le NADH, H^+ (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) qui provient de la transformation par la phosphoglycérate kinase de l'acide di-phospho 1,3-glycérique en acide 3-phosphoglycérique ;
- la diaphorase I permet donc la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine ;
- les sujets déficients spontanément en cette voie présentent 10 à 50 % de leur hémoglobine sous forme de méthémoglobine en dehors de toute intoxication.

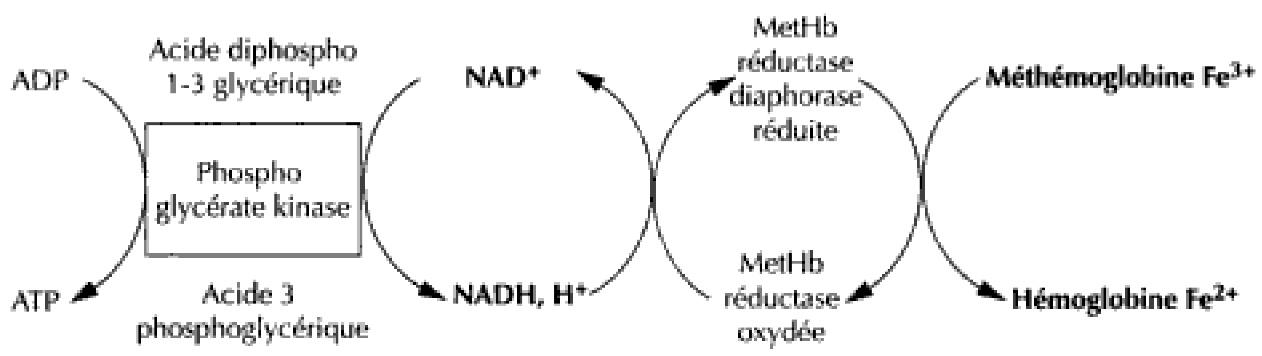


Figure 7. Catabolisme de la méthémoglobine : voie NAD dépendante

b) Voie NADPH, H^+ dépendante (*fig. 8*)

- c'est physiologiquement une voie accessoire ;
- le rendement est normalement faible voire nul dans certaines espèces animales.

Cette voie n'entre réellement en jeu qu'en présence d'un transporteur exogène d'électrons comme le bleu de méthylène :

- elle est liée à la glycolyse aérobie de la voie dite des pentoses (de Dickens-Horecker) ;
- l'enzyme est la méthémoglobine réductase (diaphorase II) ;
- le cofacteur est le NADPH, H^+ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui provient de l'oxydation par la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) du glucose 6-phosphate en acide 6-phosphogluconique, puis par l'acide 6-phosphogluconique déshydrogénase de l'acide 6-phosphogluconique en ribulose 5-phosphate ;
- la diaphorase II sous forme réduite permet donc la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine ;
- il existe de rares cas de déficiences en méthémoglobine réductase (diaphorase II), mais les sujets déficients en G6PD présentent une carence en cette voie du fait du manque en NADPH, H^+.

c) Voie du glutathion

- c'est une voie secondaire qui permet la réduction de 10 à 15 % de la méthémoglobine physiologique ;
- c'est une voie lente ;
- elle est liée comme la précédente à la voie des pentoses – le cofacteur est le NADPH, H^+ ;

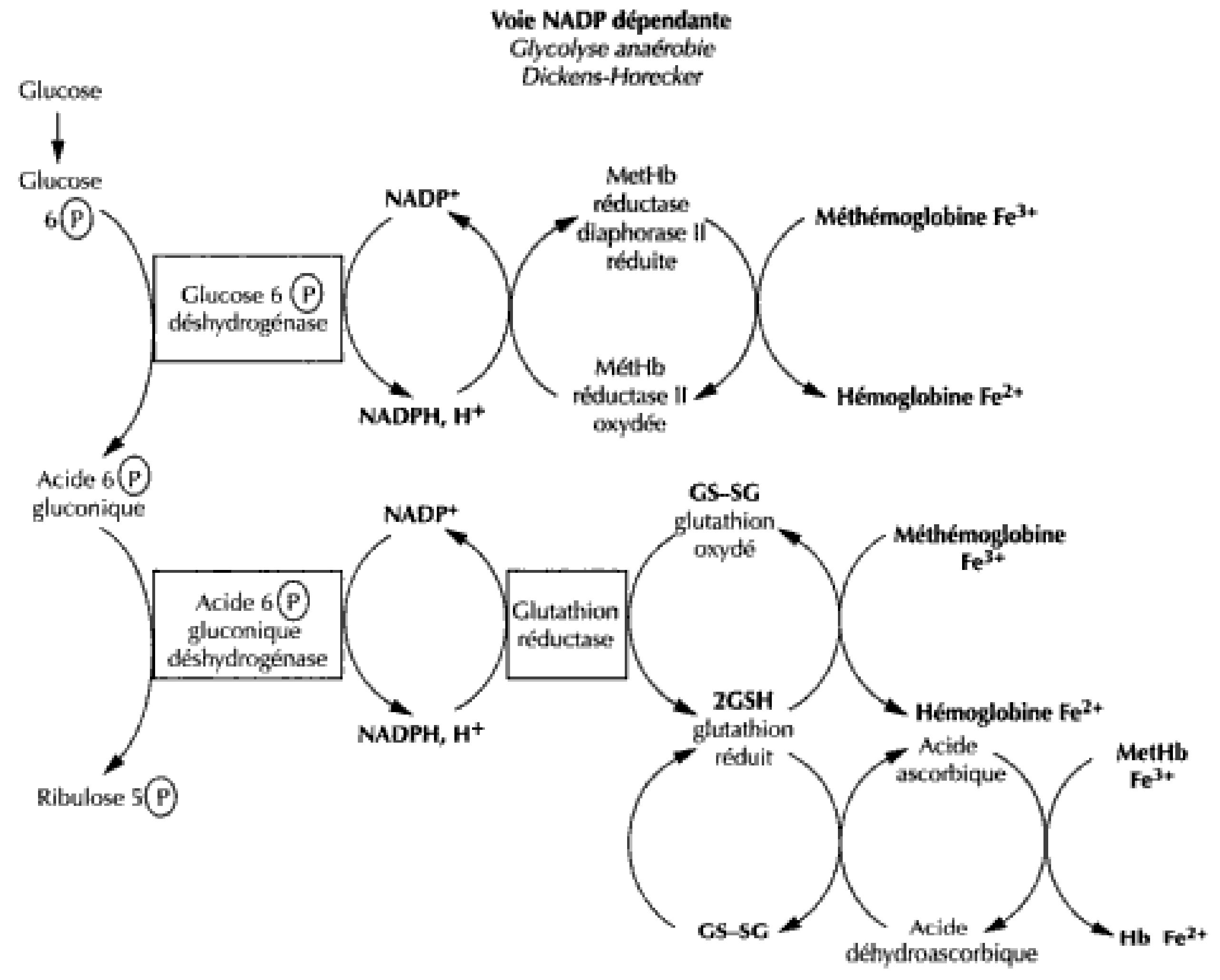


Figure 8. Catabolisme de la méthémoglobine : voie NADP dépendante

- l'enzyme est la glutathion réductase ;
- la glutathion réductase réduit à l'aide du NADPH, H^+ le glutathion oxydé en glutathion réduit ;
- le glutathion sous sa forme réduite permet la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine.

d) Voie de l'acide ascorbique

- c'est une voie secondaire qui permet la réduction de moins de 15 % de la méthémoglobine physiologique ;
- c'est une voie très lente et insuffisante pour avoir un rôle important en cas d'intoxication ;
- elle est liée comme les précédentes à la voie des pentoses ;
- c'est le glutathion qui permet la réduction de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique ;
- l'acide ascorbique permet la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine ;
- les sujets atteints de scorbut ne présentent pas de méthémoglobinémie anormale.

e) Autres voies mineures

Le NADH, H^+, le NADPH, H^+, la cystéine et l'ergothionéine ont également un rôle limité dans la réduction de la méthémoglobine. Le bilan global des voies cataboliques est résumé dans la *figure 9*.

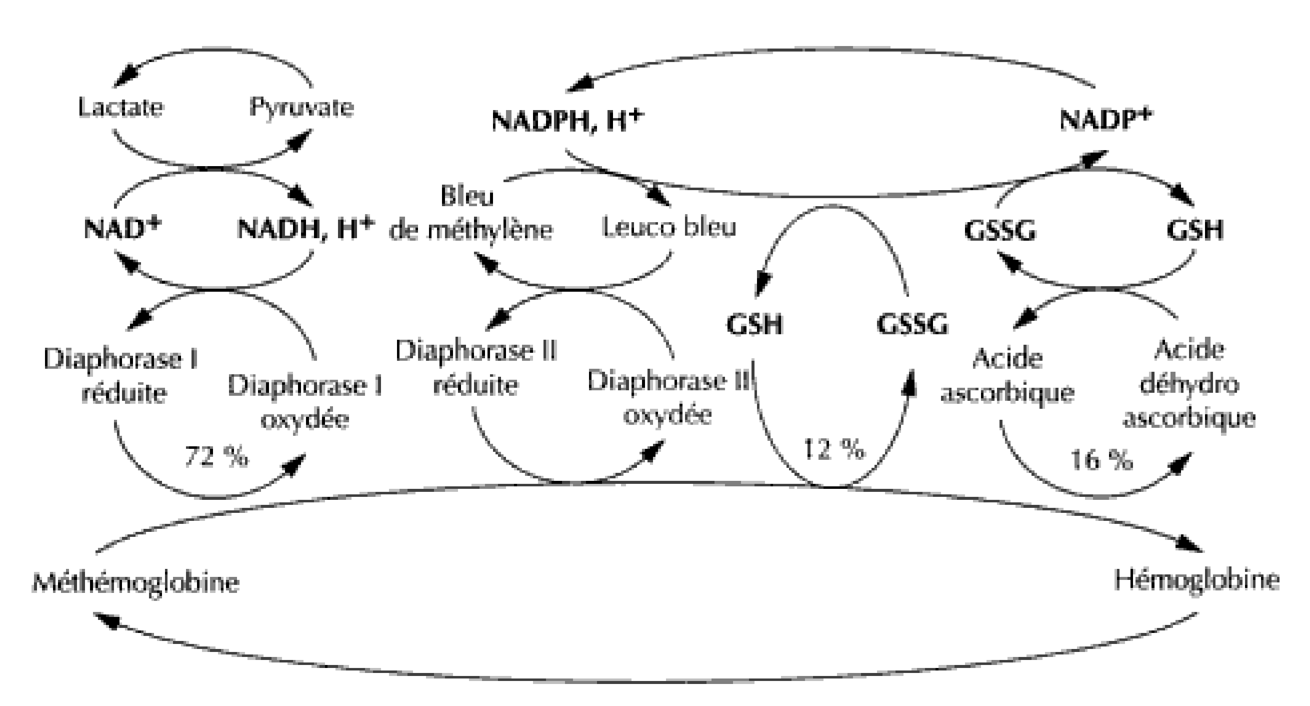


Figure 9. Catabolisme de la méthémoglobine : bilan général

D. Facteurs favorisant la formation de méthémoglobine

1. L'alcool

L'alcool stimule l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine et la voie NAD dépendante est moins efficace. D'autre part, l'alcool peut libérer certains méthémoglobinisants de leurs stocks graisseux.

2. Les « terrains digestifs »

Les sujets gastrectomisés, atteints de gastrites, de diarrhée ou de constipation présentent une plus forte sensibilité à l'action des méthémoglobinisants.

3. Les insuffisances rénale ou hépatique

4. Les nouveaux-nés ou les prématurés

- l'hémoglobine fœtale est plus sensible à l'oxydation ;
- les nouveaux-nés ou prématurés présentent une plus faible activité de la méthémoglobine réductase (diaphorase I).

5. Les sujets atteints de déficience en G6PD

- ces sujets synthétisent moins de NADPH, H^+ du fait du déficit ;
- ces sujets présentent moins de glutathion sous forme réduite puisque la glutathion réductase utilise ce cofacteur ;
- ces sujets présentent un déficit de la réduction de l'acide déhydroascorbique ;
- trois des voies de réduction présentent donc un déficit.

E. Symptomatologie de l'intoxication

La méthémoglobine est brunâtre et plus foncée que l'hémoglobine ce qui provoque une coloration gris ardoisée de la peau : c'est la cyanose.
Les symptômes sont proportionnels au taux de méthémoglobine présente dans le sang.

1. Méthémoglobine > 10 % de l'hémoglobine totale

Soit environ 15 g de méthémoglobine/L de sang :
- cyanose perceptible ;
- débute aux extrémités des doigts (ongles bleutés) ;
- envahit ensuite la face (ailes du nez, joues, lobes auriculaires), puis les lèvres et toutes les muqueuses.

2. Méthémoglobine > 20 % de l'hémoglobine totale

- le sang présente une coloration brun chocolat ;
- céphalées, vertiges, polypnées, fatigabilité ;
- tachycardie.

3. Méthémoglobine > 60 % de l'hémoglobine totale

- atteinte du système nerveux central ;
- lésions neurologiques ;
- troubles de la conscience, collapsus ;
- dépression respiratoire ;
- arrêt cardiaque.

4. Méthémoglobine > 70 à 85 % de l'hémoglobine totale

- mort du sujet.

Il s'agit du tableau d'une méthémoglobinémie pure, car le plus souvent il y a association à une hémolyse, surtout chez les sujets atteints de déficit en G6PD.

F. Traitement des méthémoglobinémies toxiques

- on procède à une évacuation du toxique par lavage gastrique si cela est encore possible et si le produit a été ingéré ;
- l'oxygénothérapie est illusoire, car elle ne peut au mieux qu'augmenter la pO_2 ; seule l'oxygénothérapie hyperbare peut être envisagée ;
- le bleu de méthylène (*fig. 10*) : il sert de transporteur d'électrons entre la diaphorase II et la méthémoglobine : ce n'est pas le bleu de méthylène qui agit directement mais sa forme réduite de leucodérivé qui se forme au contact des tissus de l'organisme ou par la méthémoglobine réductase (diaphorase II) elle-même. Le bleu de méthylène est donc délicat à manier, car lui-même est un méthémoglobinisant, on ne doit donc pas dépasser les capacités de réduction tissulaire sous peine d'aggraver la méthémoglobinémie. Il faut vérifier que le sujet n'est pas déficient en G6PD sous peine d'aggraver la méthémoglobinémie. Le traitement est

effectué par voie IV lente : 5 à 25 mL d'une solution de bleu de méthylène à 1 %. Ce traitement est utilisé si la méthémoglobinémie est supérieure à 40 % ;
- l'acide ascorbique moins actif, agit plus lentement que le bleu de méthylène, mais il est inoffensif et peut être suffisant dans les cas bénins : par administration IV de 1 g à répéter ;
- la transfusion de sang est pratiquée en cas d'hémolyse ;
- l'exsanguino-transfusion n'est réellement active que chez l'enfant. Elle peut être pratiquée chez l'adulte dans les cas graves par saignée et transfusions successives.

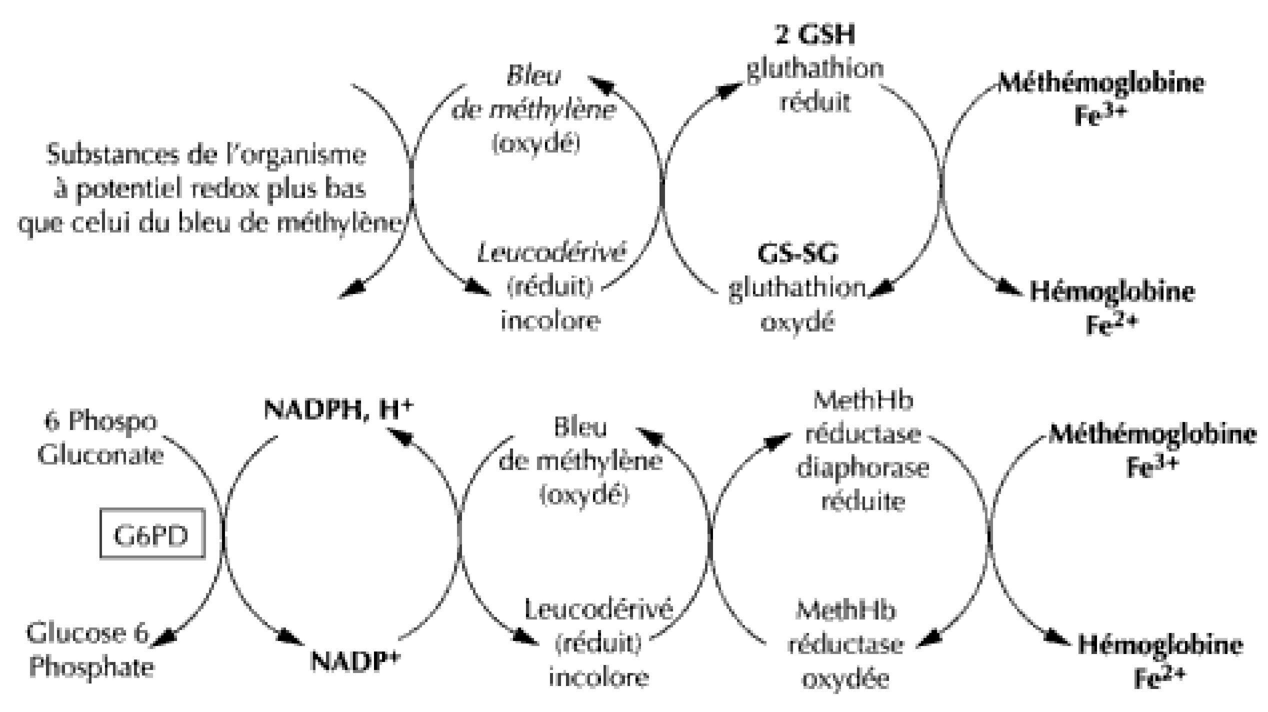


Figure 10. Mécanisme d'action du bleu de méthylène dans le traitement des méthémoglobinémies toxiques

G. Méthémoglobinisants minéraux

1. Nitrates et nitrites

Les nitrates agissent après réduction en nitrites en particulier par les bactéries qui présentent une activité nitrate réductase (bactéries buccales par exemple). Les nitrites oxydent l'hémoglobine sous sa forme oxygénée.
Quand l'hémoglobine est non liée à l'oxygène, il se forme de la méthémoglobine et de la nitrosohémoglobine selon la réaction :

$$NO_2 + 2Hb + 2H + H_2O + MetHb + HbNO$$

Lorsqu'on ajoute un excès de nitrite, il se forme de la nitrosométhémoglobine.
Origines :
- saumures ;
- engrais : les nitrates et les nitrites passent dans les légumes principalement dans les parties riches en sève brute, tiges et racines ;
- eaux polluées ;
- charcuteries ;
- fabrication de colorants azoïques.

La dose létale de nitrites est voisine de 100 mg/kg chez l'homme.

2. Chlorates

C'est un des principaux poisons méthémoglobinisants par action autocatalytique.
La dose létale est voisine de 10 à 15 g et la dose toxique est supérieure à 5 g chez l'homme.
La toxicité du chlorate de potassium est supérieure à celle du chlorate de sodium.
Les chlorates présentent une action hémolysante importante.
Ils présentent en plus une action toxique au niveau du rein (néphrite tubulointerstitielle) et du foie (nécrose cytoplasmique avec dégénérescence vacuolaire et granuleuse).
Avant les premiers symptômes, on observe, en général, une phase de latence de 8 à 12 heures.
Origines :
- allumettes ;
- teintures et colorants ;
- herbicides : accidents et suicides.

3. Permanganate de potassium

Il est utilisé comme antiseptique principalement en dermatologie.
C'est un produit très irritant sous forme solide qui induit des lésions du tube digestif.
Il est opaque aux rayons X.
Les doses létales sont voisines de 10 à 20 g chez l'homme.

4. Ferricyanure de potassium

Il existe peu de cas d'intoxication.
C'est un méthémoglobinisant stœchiométrique, il n'est actif que sur un lysat d'hématies car il pénètre mal dans l'hématie.

H. Méthémoglobinisants organiques

1. Composants aminés aromatiques *(fig. 11)*

Il s'agit des dérivés de l'aniline :
- produits pharmaceutiques phénacétine, acétanilide, benzocaïne, acide paraaminosalicylique ;
- produits d'usage industriel : aniline (colorants), toluidine, xylidine, phénylhydroxylamine ;
- produits à usage ménager : trichlorocarbanilide.

Ils agissent après avoir été métabolisés en phénylhydroxylamine ou en ses dérivés.
La phénylhydroxylamine réagit avec l'hémoglobine pour donner de la méthémoglobine et du nitrosobenzène.
Dans l'hématie intacte, des mécanismes existent pour réduire le nitrosobenzène en phénylhydroxylamine. Ces mécanismes nécessitent la présence de glucose, ce qui suggère que certains des composants du shunt des pentoses phosphates, comme le NADPH, H^+, sont impliqués dans ce cycle réductif.

2. Dérivés nitrés aromatiques (*fig. 11*)

a) Nitrobenzène et dinitrobenzène

Le nitrobenzène est utilisé en synthèse organique pour les peintures et vernis et comme succédané de l'essence d'amande amère.
Le dinitrobenzène est utilisé dans la synthèse de colorants et d'explosifs. La voie d'introduction la plus courante est la voie respiratoire.

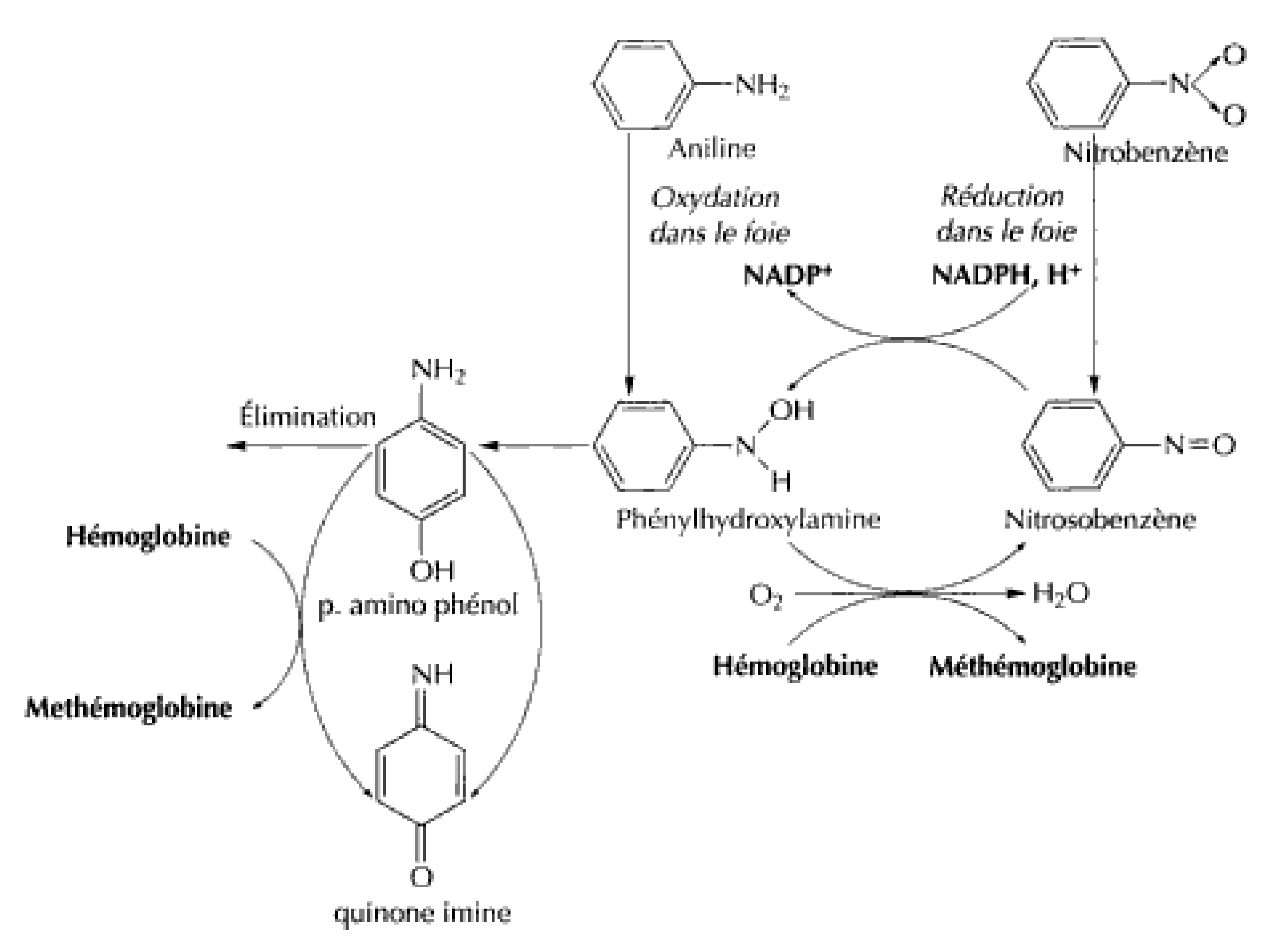


Figure 11. Mécanisme d'action toxique des dérivés aminés et nitrés aromatiques

Ces dérivés sont actifs après réduction en phénylhydroxylamine qui est l'agent méthémoglobinisant.

b) Nitrophénols

Les dérivés responsables sont le nitrophénol utilisé dans la synthèse de colorant et le dinitro 2,4-phénol utilisé dans l'industrie des explosifs et qui possède des propriétés découplantes des phosphorylations oxydatives.

c) Dérivés nitrés du toluène

Ces dérivés sont utilisés dans l'industrie des explosifs et des teintures.
Ils sont métabolisés en dérivés hydroxylaminés qui possèdent des propriétés méthémoglobinisantes, mais ils ont aussi une action toxique directe sur le système nerveux central et sur le foie (ictères graves).

d) Trinitroglycérine

Elle est utilisée comme explosif et comme vasodilatateur coronarien.

3. Autres composés organiques

a) Naphtalène

Il est utilisé en synthèse organique et comme insecticide (boules de naphtaline). On observe des cas d'intoxication surtout chez l'enfant (deux boules de naphtaline sont mortelles chez l'enfant).

b) Paradichlorobenzène

Il est employé comme désodorisant et comme antimite.

c) Polyphénols

Le résorcinol et le pyrogallol provoquent des intoxications qui peuvent survenir après ingestion mais aussi par application cutanée de pommades sur des surfaces étendues surtout chez l'enfant.
Ce sont des toxiques méthémoglobinisants et hémolysants.

d) Sulfones

Elles sont utilisées comme antilépreux.
Elles donnent des accidents en général bénins et possèdent également des propriétés hémolysantes faibles. Le dosage de la méthémoglobine fait partie de la surveillance des traitements par la Disulone®.

e) Sulfamides

Les sulfamides les plus méthémoglobinisants ont été abandonnés (comme le sulfanilamide), mais des cas peuvent s'observer en cas de traitements à très fortes doses.

f) Primaquine

Cet antipaludéen de synthèse conduit à des méthémoglobinémies de faible importance chez les sujets normaux, mais qui peuvent devenir importantes avec hémolyse chez les sujets déficients en G6PD.

g) Bleu de méthylène

Bien qu'utilisé dans le traitement de la méthémoglobinémie, le bleu de méthylène est un agent méthémoglobinisant. On l'observe en cas de surdosage lorsque les capacités de réduction de l'organisme sont dépassées ou chez les sujets déficients en G6PD.

V. Mesure de la méthémoglobine

Les prélèvements de sang doivent être effectués sur anticoagulant, le fluorure de sodium doit être proscrit car la formation de fluométhémoglobine conduit à des erreurs analytiques du fait d'un maximum d'absorption à 612 mn.
Les dosages doivent être conduits rapidement car la méthémoglobine disparaît par conservation.
Ces méthodes anciennes ont presque complètement été abandonnées.

1. Méthodes manuelles

- des méthodes gazométriques qui reposent sur la quantité d'« hémoglobine inactive » incapable de se combiner à l'oxygène ou à l'oxyde carbone. Ce sont des méthodes précises, mais longues ;
- la méthode spectrophotométrique de Dubost qui repose sur la disparition de la bande de la méthémoglobine à des dilutions croissantes ;
- la méthode de Dognon qui mesure dans le rouge l'absorption avant et après action du ferricyanure de potassium.

En revanche, deux méthodes sont assez couramment utilisées.

a) Méthode de Kaplan

La méthémoglobine et l'oxyhémoglobine présentent toutes deux, deux maximums d'absorption distincts (*fig. 12*) :

- oxyhémoglobine 540 et 577 nm ;
- méthémoglobine 500 et 632 nm.

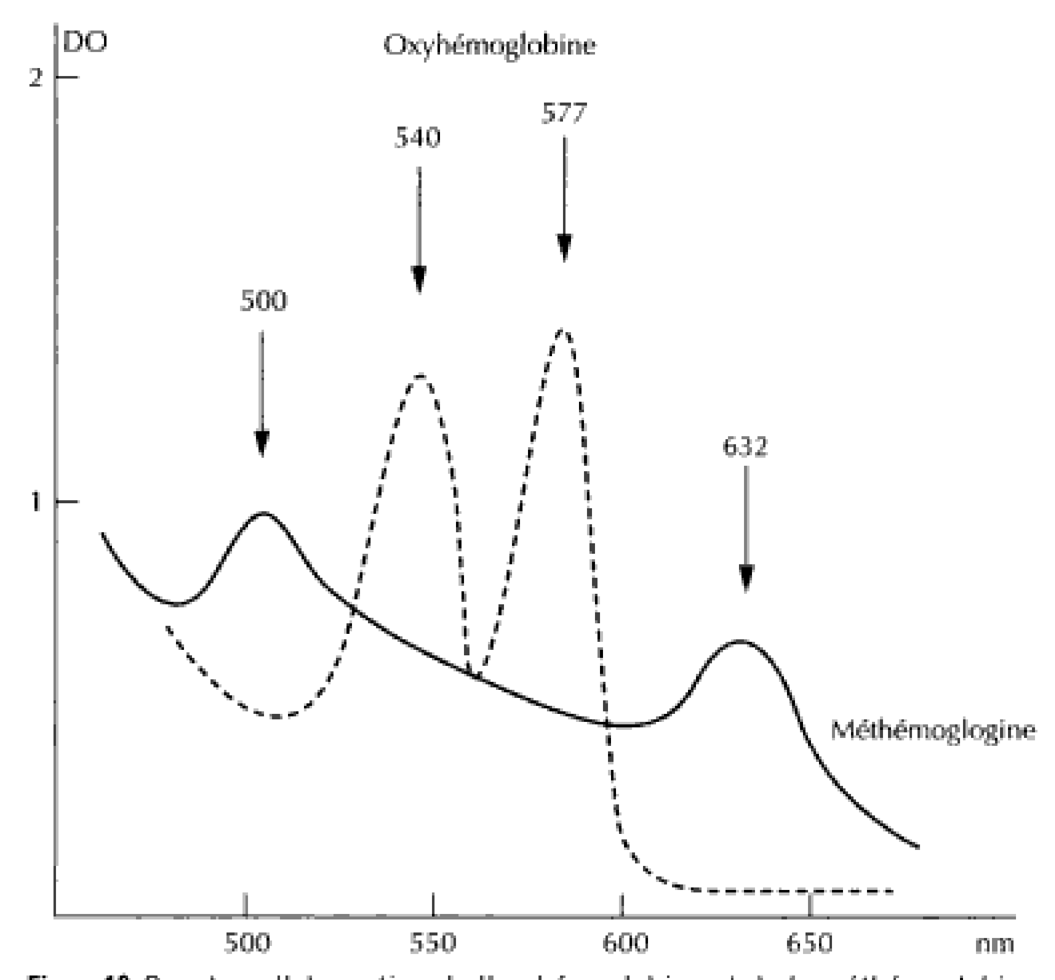


Figure 12. Spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la méthémoglobine

On fait deux mesures de densité optique :

- l'une à 525 nm où méthémoglobine et oxyhémoglobine absorbent de la même façon ;
- l'autre à 577 nm où la différence est la plus grande.

On calcule le rapport des deux densités optiques : ce rapport varie de façon linéaire en fonction respective de la méthémoglobine et de l'oxyhémoglobine. Ce quotient

permet grâce à une abaque de déterminer le pourcentage de méthémoglobine. La méthode n'est valable que pour un mélange d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine, la présence d'autres dérivés (sulfhémoglobine, nitrosohémoglobine...) enlève au rapport toute signification.

b) Méthode d'Evelyn-Malloy

On hémolyse le sang avec une solution de tampon à pH ≈ 6,6.
On centrifuge pour éliminer le stroma cellulaire.
On effectue une série de mesures spectrophotométriques :

- on mesure l'absorption de la solution telle quelle à 635 nm qui donne une valeur A1 correspondant à l'ensemble : HbO_2 + Hb + MetHb + impuretés ;
- on ajoute une solution de NaCN transformant la méthémoglobine en cyanméthémoglobine qui a une absorption nulle à 635 nm ;
- on mesure l'absorption de cette solution à 635 nm qui donne une valeur A2 correspondant à l'ensemble : HbO_2 + Hb + impuretés ;
- la différence A1 – A2 correspond à l'absorption de la méthémoglobine ;
- dans un nouvel échantillon de l'hémolysat, on ajoute du ferricyanure de potassium qui transforme toute l'hémoglobine en méthémoglobine ;
- on mesure l'absorption de cette solution à 635 nm qui donne une valeur A'1 qui correspond à l'ensemble MetHb + impuretés ;
- à cette solution, on ajoute une solution de NaCN qui transforme la méthémoglobine en cyanméthémoglobine ;
- la mesure de l'absorption à 635 nm donne une valeur A'2 qui correspond aux impuretés ;
- la différence A'1 – A'2 correspond à la quantité de méthémoglobine présente après action du ferricyanure de potassium et donc à la quantité d'hémoglobine totale contenue dans l'échantillon ;
- le rapport donne la proportion de méthémoglobine contenue dans le sang analysé.

2. Méthodes automatiques

Elles ont tendance à supplanter les méthodes manuelles, longues et délicates. Ces méthodes effectuent des mesures spectrophotométriques des différentes formes de l'hémoglobine à plusieurs longueurs d'onde. Elles sont adaptées sur des automates couplés à un microprocesseur.
En dehors de ces déterminations, il convient de demander au laboratoire l'identification et éventuellement le dosage de l'agent responsable de l'action méthémoglobinisante.

VI. Poisons hémolysants

Il existe deux grands types d'hémolyses toxiques :

- hémolyses liées à un défaut de l'hématie ;
- hémolyses par action directe sur l'hématie.

A. Hémolyses liées à un défaut de l'hématie

1. Défauts en glucose 6-phosphate déshydrogénase

Il s'agit d'une maladie héréditaire liée au chromosome X et retrouvée chez 10 % des Noirs Américains, chez les populations du bassin méditerranéen (Juifs sépharades, Grecs, Sardes).
Le rôle de cette enzyme a été rappelé dans le chapitre précédent (*fig. 1*).
De plus, le glutathion sous sa forme réduite est indispensable pour de nombreuses fonctions de l'hématie :
- nécessaire pour certaines enzymes : hexokinase, glycéraldéhyde 3-phosphodéshydrogénase ;
- nécessaire au maintien des groupements sulfhydryl dans l'hématie et dans la membrane de l'hématie.

Tout produit qui se combine au glutathion ou qui l'oxyde peut provoquer des hémolyses toxiques : les sujets déficients en G6PD sont donc particulièrement sensibles. Tous les méthémoglobinisants provoquent donc des hémolyses toxiques chez ces sujets.
Exemple : la primaquine, il s'agit d'un antimalarique développé à partir de 1925, mais surtout très utilisé par les Américains pendant la Seconde Guerre mondiale dans la guerre du Pacifique.
Les sujets déficients en G6PD présentent dans les 2 à 3 jours qui suivent le début du traitement :
- des urines colorées ;
- des douleurs musculaires ;
- une anémie avec ictère.

L'hémolyse touche surtout les hématies âgées (> 60 jours).
D'autres produits sont responsables de ces hémolyses (*tab. 1*).

2. Défauts en d'autres systèmes enzymatiques

Ces défauts sont plus rares comme par exemple le défaut en glutathion réductase :
- héréditaire : très rare car il est associé à de nombreux désordres cliniques ;
- acquis : par carence en riboflavine, car la glutathion réductase a le FAD^+ comme coenzyme.

3. Défauts de la membrane

La sphérocytose par exemple augmente la sensibilité à l'action des agents hémolysants.

4. Anomalies de l'hémoglobine

Les hémoglobines qui présentent une modification de la structure de la globine au voisinage de la zone de fixation de l'hème fragilisent l'hématie. Cette modification de structure augmente le risque de perte de l'hème de l'hémoglobine sous l'action d'un agent oxydant.

Tableau 1. Médicaments et produits chimiques pouvant entraîner une méthémoglobinémie et une hémolyse particulièrement chez les sujets déficients en G6PD érythrocytaire

Antimalariques	
8-Aminoquinoléines (primaquine, pamaquine…)	Mépacrine (quinacrine) Chloroquine, Quinine
Sulfamides	
Sulfacétamide Sulfanilamide	Sulfapyridine
Nitrofuranes	
Nitrofurantoïne Nitrofurazone	Furazoliclone
Sulfones	
Dapsone Sutoxasone	Solapasone Thiazolsulfone
Autres agents anti-infectieux	
Acide paraaminosalicylique Chloramphénicol	Néoarsphénamine Streptomycine
Anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques	
Acétanilide Acide acétylsalicylique Antipyrine Paracétamol	Amiclopyrine Phénacétine Phénazopyridine
Analogues synthétiques de la vitamine K (hydrosolubles)	
Anesthésique local	
Benzocaïne	
Dérivés aminés et nitrés	
Aniline Paraaminopropiophénone Nitrophénols Nitrobenzènes	Dérivés de l'aniline Phénylhydrazine Nitrotoluènes pNitroaniline
Produits et médicaments divers	
Quinidine Probénécide Dimercaprol	Bleu de méthylène Naphtalène Fèves

C'est ce que l'on observe par exemple avec les sujets porteurs de l'hémoglobine Zurich. Cette anomalie a été découverte chez un enfant qui a présenté une anémie hémolytique à la suite de la prise de sulfamides et qui avait une activité G6PD normale.
Il s'agit d'une maladie héréditaire dominante, on retrouve chez ces sujets la présence de corps de Heinz dans les hématies.
Les corps de Heinz se caractérisent par des granules de couleur noire, fixés de façon forte aux fonctions thiols de la membrane érythrocytaire.
Ces corps de Heinz conduisent à des déformations de l'hématie, provoquant une capture splénique prématurée ; ils provoquent par ailleurs une fragilisation de la membrane de l'hématie ce qui la rend plus sensible à l'hémolyse.

Les produits qui provoquent la formation des corps de Heinz sont les méthémoglobinisants précédemment cités, mais d'autres produits peuvent les induire comme par exemple : le propylène glycol, l'acide ascorbique. les sulfites, les arsines.
D'autres anomalies de l'hémoglobine sont capables de provoquer des hémolyses, c'est le cas par exemple des hémoglobines Torino, H, ou Köhn.

B. Hémolyses par action directe

1. Venins et toxines

Parmi les nombreuses enzymes contenues dans les venins de serpents ou de certains insectes, on trouve des lécithinases et des phospholipases (A2, B, C). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les phospholipides et les lécithines des parois cellulaires, ce qui conduit à une lyse de ces parois et donc à l'hémolyse quand le venin passe dans la circulation sanguine.
La phospholipase A2 est la plus répandue. Il s'agit d'une protéine dimérique et de poids moléculaire de 29 100 à 100 000 selon les espèces. On la trouve par exemple dans les venins de cobra, de naja, de crotale, de certains serpents australiens et dans le venin d'hyménoptères (abeille, guêpe).

2. Produits chimiques

Il s'agit de produits agissant sur les fonctions thiol, parmi eux un des agents les plus actifs est l'hydrogène arsénié AsH3.
AsH3 se forme à chaque fois qu'un dérivé qui contient de l'arsenic est en présence d'hydrogène naissant (acide agissant sur des métaux impurs, réparation de hauts fourneaux, nettoyage des boues d'électrolyse) ou par action de l'eau sur les arséniures.
Les propriétés hémolysantes de l'hydrogène arsénié sont dues aux propriétés réactives de l'arsenic vis-à-vis des groupements sulfhydryles (– SH) et en particulier ceux du glutathion.
D'autres gaz présentent les mêmes propriétés, comme par exemple l'hydrogène antimonié (SbH3).

C. Mécanismes immunologiques

Certains composés chimiques induisent une réaction immunologique responsable secondairement d'hémolyse.
Deux types principaux de mécanismes immunologiques peuvent conduire à une hémolyse.

1. Les réactions d'hypersensibilité de type II

Le produit responsable de la réaction toxique se fixe sur la membrane de l'hématie et joue le rôle d'haptène. Il y alors synthèse d'anticorps qui, lors d'une nouvelle exposition, va conduire à une réaction anti gène-anticorps qui après fixation du

complément conduit à la lyse de la membrane cellulaire et donc à l'hémolyse. De nombreux médicaments peuvent être responsables de ce type de réaction, parmi eux les phénothiazines, la quinidine, la quinine, les sulfamides, les tétracyclines, les pénicillines.
Dans ces réactions, les anticorps peuvent être décelés par réaction d'agglutination (type Coombs).
Les anticorps peuvent être de type complet ou incomplet.

a) Anticorps complets

C'est le type des anticorps induits par la quinidine. Ce sont des IgM capables d'agglutiner les hématies qui portent l'antigène à leur surface.

b) Anticorps incomplets

C'est le type des anticorps induits par la pénicilline. Ils sont incapables d'agglutiner les hématies qui portent l'antigène. Pour obtenir une agglutination *in vitro*, il faut soit ajouter un anticorps antigammaglobulines humaines, soit traiter les érythrocytes par une enzyme protéolytique, soit être en solution visqueuse (albumine bovine à 20 pour 100).
In vivo, il y a deux grands types d'anticorps incomplets :
- des anticorps qui ne réagissent qu'à une température inférieure à 32 °C qui sont des agglutinines froides et qui sont de type IgM. Elles provoquent après fixation du complément des épisodes d'hémolyse seulement en cas de refroidissement corporel ;
- des anticorps qui réagissent à 37 °C, ils sont du type IgG.

2. Les anémies hémolytiques auto-immunes

Certains produits comme la méthyldopa, la lévodopa, l'acide méfénamique peuvent induire une véritable réaction auto-immune avec production d'autoanticorps ayant une spécificité anti-Rhésus. Le test de Coombs est positif chez un nombre important de patients traités. Cet effet est généralement sans conséquence clinique, mais il induit chez quelques sujets une anémie hémolytique sans qu'il soit possible de retrouver des anticorps dirigés contre le médicament. La suspension du traitement entraîne généralement une négativation du test de Coombs et l'arrêt de l'anémie hémolytique.
Les anémies hémolytiques auto-immunes répondent généralement à un traitement par corticothérapie.

D. Conséquences de l'hémolyse

- le contenu de l'hématie en potassium est d'environ 100 mmol/L, tandis que celle du plasma est de 4 mmol/L. En supposant l'hémolyse totale, on observerait une kaliémie de 47 mmol/L, taux très supérieur au seuil provoquant l'arrêt cardiaque. En fait, les altérations hémodynamiques et électriques du muscle cardiaque commencent dès 6 mmol/L, ce qui représente une hémolyse d'environ 13 % des érythrocytes. Cependant, en cas d'hémolyse progressive, le potassium est éliminé par redistribution tissulaire et excrétion rénale ;

- les adénosines nucléotides, principalement l'ATP, sont présents dans l'hématie à la concentration de 0,5 mmol/L. Ces dérivés ont une action pharmacologique marquée ; en particulier, les nucléotides libérés lors de l'hémolyse de 1 % des hématies provoquent un effet vasodilatateur marqué ;
- quand l'hémolyse survient, l'hémoglobine libérée forme un complexe avec l'haptoglobine (α2 globuline). Le complexe haptoglobine-hémoglobine est piégé lentement par le foie. Si l'hémolyse est sévère et l'haptoglobine saturée, l'hémoglobine est éliminée dans les urines. Cette élimination urinaire survient quand la concentration plasmatique en hémoglobine est supérieure à 1 g/L. En cas d'hémoglobinurie prononcée, les urines sont foncées ; dans les urines acides, il se forme de la méthémoglobine. Dans les tubules, au moment de la concentration des urines, l'hémoglobine dépasse son seuil de solubilité et précipite dans la lumière du tubule. Le blocage qui en résulte provoque une oligurie avec des zones de nécrose tubulaire et parfois une anurie ;
- les débris de l'érythrocyte ont une activité thrombogène et peuvent provoquer l'apparition de thrombus, mais la déplétion en plaquettes qui en résulte peut aussi induire des hémorragies ;
- l'hémolyse due à une réaction antigène-anticorps peut conduire à une réaction de type anaphylactique ;
- quand le taux de production de la bilirubine, formée à partir de l'hème de l'hémoglobine, excède le taux d'épuration hépatique, on observe une hyperbilirubinémie et un ictère. La bilirubine est principalement sous forme non conjuguée ;
- en cas d'épisodes d'hémolyse à répétition ou en cas d'hémolyse en continu, se produit une hyperplasie du tissu érythropoïétique. La proportion de réticulocytes dans le sang peut alors augmenter au-dessus des limites normales de 2 % et peut augmenter jusqu'à 30 % dans les anémies hémolytiques sévères. On peut même observer le passage sanguin d'érythroblastes ;
- dans les cas d'hémolyses chroniques, on observe une augmentation de l'activité du système réticulo-endothélial chargé d'éliminer les produits de l'hémolyse de la circulation se traduisant essentiellement par une splénomégalie.

Pour en savoir plus

- Boeckx RL. *Lead poisoning in children*. Anal Chem 50 1986 ; 2 : 274A287A.
- Bowmann WC, Rand MJ. *Textbook of Pharmacology*, second edition, Blackwell scientific publications 1980.
- Auteurs Critères d'Hygiène de l'environnement n° 3 : le Plomb. OMS 1978.
- Faivre M, Faivre J, Armand J. *Les méthémoglobinémies toxiques*. Collection de médecine légale et de toxicologie médicale. Masson éditeur 1970 ; 1120.
- Gossel AT, Bricker J. *Principes of clinical toxicology*, Raven Press 1984.
- Gossel TA, Bricker J.-D. *Principles of clinical Toxicology*, Raven Press 1984. Critères d'Hygiène de l'environnement n° 13 : Monoxyde de Carbone. OMS 1980.
- Goyer RH. *Toxic effects of metals* dans « Casarett and Doull's Toxicology ». Klassen CD Amdur MO Doullj edits. 3e édition. Mac Millan Publishing Company 1986.
- Habibi B. *Anémies hémolytiques auto-immunes*. Sem hôp Paris 1985 ; 61 : 27352737.
- Hathway DE. *Molecular aspects of Toxicology*. Royal Society of chemistry. Burlington house. London 1984.
- Klassen CD, Amdur MO, Doull J. edits Titre. 3e édition. Mac Millan Publishing Com pany.1986.

- Lauwerys RR. *Toxicologie industrielle et intoxications préfessionnelles*. 2[e] édition. Masson éditeur 1982.
- Auteurs *Manuel Merck de diagnostique et thérapeutique*. édit SIDEM 1988.
- Nordmann Y, Devars du Mayne J.-F. *Dépistage du saturnisme chronique*. Press Med 13 1984 ; 35 : 2137-2141.
- Sauter E. *Druginduced anemia*, Fed. Proc 1972 ; 31 : 141146.
- Smith RP. *Toxic responses of the blood* in Casarett and Doull's Toxicology third edition. Klaassen, Amdur MO, Douil J. éditeurs, Macmillan publishing compagny, New York, 1986 ; 223244.
- Smith RP. *Toxic responses of the blood*, dans « Casarett and Doull's Toxicology ». Remettre les références ?

Santé publique – Législation

Établissements de santé, structures de tutelle et pharmacies à usage intérieur

M. AULOIS-GRIOT, Service de droit et économie de la santé,
INSERM U 657, Université Victor Segalen Bordeaux 2.
F. TABOULET, Service de droit pharmaceutique et économie de la santé,
INSERM U 558, Université Paul Sabatier Toulouse 3.

Il semble que la création des hôpitaux remonte à l'époque romaine, mais c'est surtout avec le christianisme que ces institutions ont vu le jour. Ainsi, l'Église avait pris l'initiative de créer des hospices et des Hôtels-Dieu destinés à héberger des indigents et des pèlerins. Il s'agissait alors essentiellement de lieux charitables dans lesquels, à l'occasion, quelques soins étaient dispensés. Il faut attendre la Révolution française et la loi du 16 vendémiaire an V (7 octobre 1796) pour assister à une laïcisation des hôpitaux, placés désormais sous la surveillance des administrations communales.
Jusqu'au début du xxe siècle, l'hôpital a conservé sa fonction d'hébergement des indigents. Accueillant peu à peu des catégories de malades autres que les pauvres, les infirmes et les enfants, son rôle social est toutefois resté longtemps prépondérant. En effet, ce n'est que vers 1958-1960 que l'hôpital devient exclusivement une institution sanitaire. C'est également à partir de cette date que le système hospitalier français fait l'objet de nombreuses réformes, se succédant les unes aux autres, parmi lesquelles on peut souligner :
- *la loi n° 70-1318 du 31 décembre 1970 portant réforme hospitalière instaurant le service public hospitalier et la planification hospitalière ;*
- *la loi n° 91-738 du 31 juillet 1991 visant à optimiser l'offre de soins pour assurer une meilleure qualité dans les meilleures conditions économiques et dynamiser les hôpitaux publics ;*
- *l'ordonnance n° 96-346 du 24 avril 1996 portant réforme de l'hospitalisation publique et privée qui crée des agences régionales d'hospitalisation et met en place la contractualisation et l'accréditation ;*
- *l'ordonnance n° 2005-406 du 2 mai 2005 qui simplifie le régime juridique des établissements de santé ; on parle alors de nouvelle gouvernance hospitalière.*

I. Système hospitalier français

A. Notion d'établissement de santé

Le système hospitalier français peut se définir par l'énoncé des missions des établissements qui le composent. Il se caractérise également par la grande diversité de ses établissements, tant sur le plan de leur statut juridique, que de leur capacité d'accueil ou de leur périmètre d'action.

1. Missions des établissements de santé

Il convient de distinguer les missions communes à l'ensemble des établissements de santé, et les missions spécifiques au service public hospitalier

a) Missions communes

Si le Code de la santé publique ne définit pas ce qu'il faut entendre par établissement de santé, pour autant, il énumère les missions qui lui sont dévolues (Art. L. 6111-1 du Code de la santé publique). Qu'ils soient publics ou privés, les établissements de santé assurent les examens de diagnostic, la surveillance et le traitement des malades, des blessés et des femmes enceintes, en tenant compte des aspects psychologiques des patients.

Ils participent à des actions de santé publique et notamment à toute action médico-sociale coordonnée, et à des actions d'éducation pour la santé et la prévention.
Ils ont pour but de dispenser :

- avec ou sans hébergement : des soins de courte durée ou concernant des affections graves pendant leur phase aiguë en médecine, chirurgie, obstétrique, odontologie ou psychiatrie ; des soins de suite ou de réadaptation dans le cadre d'un traitement ou d'une surveillance médicale à des malades requérant des soins continus dans un but de réinsertion ;
- des soins de longue durée, comportant un hébergement pour des personnes n'ayant pas leur autonomie de vie et dont l'état nécessite une surveillance médicale constante et des traitements d'entretien.

Par ailleurs, dans le cadre du renforcement de la veille sanitaire, la loi du 1er juillet 1998 leur fait obligation d'organiser la lutte contre les infections nosocomiales et les affections iatrogènes, et de mettre en place un dispositif de vigilance couvrant les différents produits de santé que sont les médicaments, les dispositifs médicaux (y compris les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*), les produits issus du corps humain (produits sanguins, organes, tissus, cellules, etc.), les produits de thérapie génique et cellulaire, les aliments diététiques.
Enfin, la loi du 4 mars 2002 relative aux droits des malades exige des établissements de santé qu'ils se préoccupent des questions d'ordre éthique, en particulier au travers de la prise en charge des patients.

b) Missions spécifiques au service public hospitalier

Outre les missions générales auxquelles doit répondre l'ensemble des établissements de santé, ceux qui participent au service public hospitalier se voient confier des missions spécifiques. À ce titre, ils doivent prendre part :

- à l'enseignement universitaire et postuniversitaire ;
- à la formation continue des praticiens hospitaliers ;
- à la recherche médicale, odontologique et pharmaceutique ;
- à la formation initiale et continue des sages-femmes et du personnel paramédical, ainsi qu'à la recherche dans leurs domaines de compétence ;
- aux actions de médecine préventive et d'éducation pour la santé et à leur coordination ;
- conjointement avec les praticiens hospitaliers et les autres professionnels de santé, personnes et services concernés, à l'aide médicale urgente ;
- à la lutte contre l'exclusion sociale, en relation avec les autres professions et institutions compétentes en ce domaine, ainsi que les associations œuvrant dans le domaine de l'insertion et de la lutte contre l'exclusion, dans une dynamique de réseaux ;
- aux soins aux détenus en milieu pénitentiaire.

Il est à noter que seuls les établissements participant au service public hospitalier et qui ont l'autorisation de dispenser des soins de courte durée ou concernant des affections graves dans leur phase aiguë en médecine, chirurgie, obstétrique, odontologie et psychiatrie peuvent comporter une ou plusieurs unités participant au service d'aide médicale d'urgence (SAMU).

Le service public hospitalier impose aux établissements qui y participent un certain nombre d'obligations (Art. L. 6112-2 du Code de la santé publique) :

- l'égalité de tous les malades dans les soins comme dans l'hébergement ; aucune discrimination ne peut être établie et ces établissements ont obligation d'accueillir toute personne ayant besoin de soins hospitaliers ;
- la continuité dans le fonctionnement du service public, 24 heures sur 24 ; ainsi ce principe impose la mise en place d'un service de garde et d'astreinte, et, en cas de grève, il appartient au directeur de prendre les mesures nécessaires pour maintenir un personnel suffisant dans les services où les soins ne peuvent être interrompus ;
- l'adaptabilité du service public hospitalier aux besoins sanitaires du pays.

Participent au service public hospitalier, l'ensemble des établissements publics de santé, ainsi que le service de santé des armées, les centres de lutte contre le cancer et les établissements privés qui en font la demande et s'engagent à se soumettre aux obligations du service public (égalité des soins, continuité et adaptabilité) comme le font les établissements publics.

2. Typologie des établissements

Parmi les établissements de santé, on peut distinguer les établissements de santé publics (hôpitaux) et les établissements de santé privés (cliniques) (*tab. 1*). L'appartenance au secteur public ou au secteur privé a une incidence sur le mode de financement (même si la différence entre établissements publics et privés a tendance à s'estomper) et les règles comptables, le statut du personnel et la mise en jeu de la responsabilité. Les établissements se verront appliquer les règles de droit public (pour les établissements de santé publics) ou celles du droit privé (pour les établissements de santé privés).

Tableau 1. Panorama des 3 000 établissements de santé français en 2003

PUBLIC	PRIVÉ
1/3 des établissements	2/3 des établissements
65 % des lits d'hospitalisation	35 % des lits d'hospitalisation répartis comme suit :
29 CHR	• 10 % PSPH *
163 CHG	• Non-PSPH * :
314 hôpitaux locaux	– 5 % à but lucratif
93 CHS (Psychiatrie)	– 20 % à but non lucratif

(PSPH * : participant au service public hospitalier)
Source : Site du ministère chargé de la santé (www.sante.gouv.fr)

a) Établissements publics de santé

Personnes morales de droit public, les établissements publics de santé sont dotés de l'autonomie administrative et financière. Il est possible de les classer en fonction de la nature des soins qu'ils dispensent. Ainsi, on peut distinguer les établissements de court séjour, de moyen séjour (pour les malades convalescents) ou de long séjour (pour les malades chroniques). Mais cette distinction peut paraître délicate lorsque l'on veut définir chaque catégorie de séjour. La loi de 1991 ne retient que deux catégories d'établissements publics de santé.

■ *Centres hospitaliers*

Certains ont une vocation régionale (centre hospitalier régional ou CHR) ; ils se caractérisent par leur haute spécialisation et figurent sur une liste établie par décret. La plupart des centres hospitaliers régionaux ont passé une convention avec une université comportant une ou plusieurs unités de formation et de recherches médicales, pharmaceutiques ou odontologiques ; ces centres hospitaliers régionaux sont alors appelés centres hospitaliers universitaires (CHU).

■ *Hôpitaux locaux*

Il s'agit de structures de petite taille et de proximité qui ont pour objet de dispenser avec ou sans hébergement des soins de courte durée en médecine, des soins de suite ou de réadaptation, et avec hébergement des soins de longue durée. Par ailleurs, ils participent aux actions de santé publique et aux actions médico-sociales coordonnées, aux actions de médecine préventive et d'éducation pour la santé, aux actions de maintien à domicile, en liaison avec les professionnels de santé locaux. Pour pouvoir assurer les soins en médecine, ces hôpitaux locaux doivent passer une convention avec un ou plusieurs centres hospitaliers ou établissements de santé privés, dont l'un au moins dispense des soins en médecine et chirurgie et dispose d'un service ou d'une unité soit de réanimation, soit de soins intensifs.

b) Établissements de santé privés

On distingue les établissements à but lucratif (sociétés ou entreprises individuelles à caractère commercial) des établissements à but non lucratif (associations, fondations, congrégations…). À leur demande, les établissements de santé privés peuvent participer au service public hospitalier. À ce titre, ils sont soumis aux obligations du service public (*cf. supra*) et doivent se doter d'un projet d'établissement. La décision d'admission à participer au service public hospitalier est prise par le directeur de l'agence régionale de l'hospitalisation. Le refus d'admission doit être motivé.

Les établissements de santé privés peuvent également conclure avec l'État un contrat de concession pour l'exécution du service public hospitalier. À condition de s'engager à respecter les obligations du service public hospitalier, ces établissements se voient reconnaître un véritable monopole d'activité dans le secteur géographique considéré, l'État s'engageant à n'autoriser ni admettre, dans la zone et pendant une période déterminée, la création ou l'extension d'aucun autre établissement ou service d'hospitalisation de même nature.

c) Autres critères

Outre cette distinction classique entre établissements de santé privés et publics, il est possible de distinguer les établissements de santé en fonction du type d'hébergement proposé. Ainsi, il existe des établissements de santé sans hébergement parmi lesquels on peut citer :

- les centres de dialyse ;
- les consultations externes : les patients viennent à l'hôpital, en consultation, le plus souvent avant ou après une intervention chirurgicale ;
- la chirurgie ambulatoire : elle permet la réalisation de petits actes chirurgicaux, avec pour le patient la possibilité de rentrer chez lui le soir même de l'opération.

Par ailleurs, certaines structures sont spécialisées dans l'accueil de certains patients :

- centres hospitaliers spécialisés : établissements dédiés aux malades psychiatriques, ils assurent le service public hospitalier ;
- centres de lutte contre le cancer : il s'agit d'établissements de santé privés qui participent au service public hospitalier et qui dispensent des soins spécialisés en cancérologie ;
- centres spécialisés de soins aux toxicomanes : ils assurent des actions de prévention et de soins aux personnes toxicomanes et peuvent être gérés par des associations ou par des établissements hospitaliers.

d) Coopération entre établissements de santé

Elle vise à optimiser l'offre de soins en permettant une meilleure complémentarité entre établissements. Elle peut prendre les formes suivantes :

- conférences sanitaires : constituées par le directeur de l'agence régionale d'hospitalisation, elles réunissent des représentants des établissements de santé, des professionnels de santé libéraux, des centres de santé, des élus et des usagers du territoire concerné ;
- syndicats interhospitaliers : autorisés par le directeur de l'agence régionale d'hospitalisation, ils permettent aux établissements qui en font partie la création et la gestion de services communs, la formation et le perfectionnement du personnel, l'étude et la réalisation de travaux d'équipement, la création et la gestion de nouvelles installations nécessaires pour répondre aux besoins sanitaires de la population.

B. Organisation administrative et financière des établissements publics

1. Organisation administrative

Les établissements publics de santé sont administrés par un conseil d'administration et un conseil exécutif, et dirigés par un directeur nommé par le ministre.

a) Conseil d'administration

Le conseil d'administration des établissements publics de santé comprend six catégories de membres :

- des représentants élus des collectivités territoriales ;
- des représentants des usagers ;
- des représentants du personnel médical, odontologique et pharmaceutique ;
- des représentants de la commission des soins infirmiers ;
- des représentants du personnel ;
- des personnalités qualifiées (médecin, personnel paramédical, etc.).

La présidence du conseil d'administration est traditionnellement assurée par le maire pour les établissements communaux, le président du conseil général pour les établissements départementaux.

Le conseil d'administration a des attributions très larges. Il définit la politique générale de l'établissement et il délibère notamment sur :

- le projet d'établissement, document qui détermine les moyens d'hospitalisation, de personnel et d'équipement, y compris le projet médical ;
- les programmes d'investissements relatifs aux travaux et équipements matériels lourds ;
- sur le plan financier : le budget, les comptes et l'affectation des résultats d'exploitation, les emprunts ;
- les créations, suppressions, transformations de structures médicales, pharmaceutiques et odontologiques ;
- au niveau du personnel : les emplois de praticiens hospitaliers, le tableau des emplois permanents ;
- les actions de coopération et les conventions.

b) Directeur et conseil exécutif

Nommé par le ministre chargé de la Santé ou pour certains établissements (Assistance publique des Hôpitaux de Paris et de Marseille, Hospices civils de Lyon) par le premier ministre, le directeur est chargé de la préparation des travaux et de l'exécution des décisions du conseil d'administration. Par ailleurs, il a des pouvoirs qui lui sont propres :

- il représente l'établissement dans tous les actes de la vie civile et en justice ;
- il assure la gestion et la coordination générale de l'établissement sur lequel il a des pouvoirs de police et d'organisation ;
- il est responsable du personnel ; il exerce son autorité tant sur le personnel non médical que sur le personnel médical dans le respect des règles professionnelles ou déontologiques.

Créé par l'ordonnance n° 2005-406 du 2 mai 2005, le conseil exécutif a pour objectif de « mieux associer les praticiens à la gestion et à la mise en œuvre des orientations fondamentales des établissements » et ce, afin de rendre plus opérationnelles les décisions du conseil d'administration. Il est composé conjointement, d'une part du directeur et des membres de son équipe de direction qu'il désigne, d'autre part du président de la Commission médicale d'établissement et de praticiens désignés par cette commission. Le conseil exécutif prépare les mesures nécessaires à l'élaboration et à la mise en œuvre du projet d'établissement. Il prépare le projet médical ainsi que les plans de formation et d'évaluation de l'établissement.

c) Organes consultatifs

■ *Commission médicale d'établissement*

De composition variable selon qu'il s'agit d'un centre hospitalier, d'un centre hospitalier universitaire ou d'un hôpital local, la commission médicale d'établissement (CME) représente la communauté médicale et comprend donc des représentants des personnels médicaux, pharmaceutiques, et odontologiques. Parmi ses nombreuses missions, la CME :

- prépare le projet d'établissement et plus particulièrement le projet médical d'établissement ;
- organise la formation continue et l'évaluation individuelle des pratiques professionnelles en préparant les plans de formation des praticiens et les actions d'évaluation ;

- émet un avis sur le projet des soins infirmiers, de rééducation et médico-techniques ;
- émet un avis sur le fonctionnement des pôles autres que médicaux, odontologiques et pharmaceutiques, dans la mesure où ce fonctionnement intéresse la qualité des soins ou la santé des malades ;
- émet un avis sur la nomination des responsables de pôle d'activité clinique et médico-technique ;
- en formation restreinte, émet un avis sur les questions individuelles relatives au recrutement et à la carrière des praticiens.

■ *Sous-commissions chargées d'assurer la qualité et la sécurité des soins (art. L. 6144-1 CSP)*

La CME comporte au moins une sous-commission spécialisée, créée par le règlement intérieur de l'établissement, en vue de participer par ses avis à l'élaboration de la politique d'amélioration continue de la qualité et de la sécurité des soins, notamment en ce qui concerne :
- le dispositif de vigilance destiné à garantir la sécurité sanitaire des produits de santé ;
- la lutte contre les infections nosocomiales ;
- la définition de la politique du médicament et des dispositifs médicaux stériles et l'organisation de la lutte contre les affections iatrogènes ;
- la prise en charge de la douleur.

Cette ou ces sous-commissions spécialisées comportent, outre des membres désignés par la CME, les professionnels médicaux ou non médicaux dont l'expertise est nécessaire à l'exercice de ces missions.

■ *Comité technique d'établissement*

Dans chaque établissement public, il est créé un comité technique d'établissement (CTE) composé de personnel non médical relevant de la fonction publique hospitalière. Il est obligatoirement consulté sur :
- le projet d'établissement, les programmes d'investissement, le budget, et autres décisions prises par le conseil d'administration ;
- les conditions et l'organisation du travail dans l'établissement, notamment les programmes de modernisation des méthodes et techniques de travail et leurs incidences sur la situation du personnel ;
- la politique générale de formation du personnel, et notamment les plans de formation ;
- les critères de répartition de la prime de service, de la prime forfaitaire technique et de la prime de technicité.

d) Organisation interne des établissements

L'ordonnance du 2 mai 2005 prévoit une organisation des établissements de santé en pôles d'activité clinique ou médico-technique. Ces pôles sont confiés à des responsables, nommés par décision conjointe du directeur et du président de la commission médicale d'établissement, parmi les praticiens titulaires inscrits par le ministre de la Santé sur une liste nationale d'habilitation à diriger un pôle. Par un jeu de contractualisation interne, ces pôles bénéficient de délégation de gestion de la part du directeur.

2. Financement des établissements de santé

Chaque année, la loi de financement de la Sécurité sociale détermine l'objectif national des dépenses d'assurance maladie (ONDAM). En fonction de ce montant, est fixée une enveloppe destinée aux dépenses relatives aux courts séjours hospitaliers : activités en médecine, chirurgie, obstétrique et odontologie, activités d'alternative à la dialyse en centre et d'hospitalisation à domicile, dans les établissements publics et privés de santé.

Depuis le 1er janvier 2004, est appliqué pour l'ensemble des établissements publics et privés, un nouveau système de financement, directement corrélé à l'activité : la tarification à l'activité ou T2A. À partir du programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI), sont définis des « groupes homogènes de malades (GHM) », puis des « groupes homogènes de séjour (GHS) » auxquels sont associés des forfaits de séjour, ou tarifs exprimés en euros. L'objectif à moyen terme (2012) est la convergence des modes de financement des établissements publics et des établissements privés avec une grille de tarifs uniques.

En ce qui concerne le financement des produits de santé tels qu'ils ont été sélectionnés par la Commission du médicament et des dispositifs médicaux stériles (COMEDIMS : *cf. infra*) pour répondre aux besoins des malades hospitalisés, il existe un cadre général et un régime d'exception.

a) Règle générale : produits de santé dans les GHS

En principe, les produits de santé sont compris dans les forfaits de séjour. À terme, tous ont vocation à y être intégrés. Les prix de vente sont librement fixés par le fabricant et peuvent faire l'objet de négociation. Les achats sont réalisés conformément aux règles du Code des marchés publics, notamment la mise en concurrence.

b) Cas particulier : médicaments et dispositifs médicaux innovants et coûteux hors GHS

Pour éviter les risques de discordance et de sélection qu'entraîneraient des produits très coûteux, facteurs d'hétérogénéité dans les distributions des coûts par séjour, certains médicaments et dispositifs médicaux implantables, inscrits sur une liste fixée par un arrêté signé par le ministre de la Santé, font l'objet d'un financement particulier par l'Assurance maladie à l'établissement, en sus des forfaits de séjour.

Le régime de prix de ces produits est également particulier : selon les cas, il s'agira d'une liberté contrôlée ou de prix administrés. En vertu de l'accord cadre État/industrie (signé par le Comité économique des produits de santé (CEPS) et le syndicat représentant les laboratoires pharmaceutiques, les Entreprises du médicament (LEEM), le 30 mars 2004) qui affirme l'objectif conjoint de concilier maîtrise des budgets et garantie de l'accès au progrès thérapeutique, une procédure de dépôt de prix par le laboratoire au CEPS est prévue ; si ce dernier refuse le prix proposé, des négociations sont organisées ; en cas d'échec, le prix est autoritairement imposé par arrêté ministériel. Quel que soit le mode d'obtention, le « prix national » est publié au Journal officiel.

Pour réguler ces dépenses de produits très coûteux, deux types d'incitations financières concernant la pharmacie hospitalière ont été introduits :

- d'une part, sur l'assiette du remboursement (en euros) :
  le « prix national » publié constitue le prix maximal de vente aux établissements de santé ou « tarif de responsabilité » qui sert de base de remboursement pour l'Assurance maladie. En effet, le régime de liberté de prix (vers une seule direction : la diminution du prix national) est maintenu et les négociations entre pharmaciens et fournisseurs sont encouragées. Si des baisses de prix par rapport au prix plafond sont obtenues, la pharmacie à usage intérieur est « récompensée » : le remboursement par l'Assurance maladie sera basé sur le prix d'achat, majoré d'une marge d'intéressement, calculée en fonction de l'écart entre le tarif de responsabilité et le prix négocié ;
- d'autre part, sur le taux de remboursement (en pourcentage) :
  le remboursement sur la base établie ci-dessus peut ne pas être intégral, il peut être réduit jusqu'à 70 % du montant en cas de non-respect du contrat de bon usage signé entre l'établissement de santé et l'Agence régionale d'hospitalisation. Le contrat stipule notamment des engagements spécifiques sur le bon usage des produits inscrits sur la liste en sus, bon usage défini comme le respect des référentiels, établis indication par indication.

II. Tutelles exercées sur l'hôpital

A. Structures de tutelle

En France, le système de santé est sous la tutelle de l'État et dépend essentiellement du ministère chargé de la santé. Au sein de ce dernier, deux directions exercent plus particulièrement une tutelle sur les établissements de santé :

- la Direction générale de la santé (DGS) propose les objectifs et priorités de la politique de prévention et de protection de la santé ;
- et la Direction générale de l'hospitalisation et de l'organisation des soins (DHOS) détermine l'organisation de l'offre de soins, définit la réglementation relative à l'organisation et au fonctionnement des établissements publics de santé, met en œuvre et assure le suivi des règles de tarification et de régulation financière des établissements de santé.

Outre le ministère représenté dans les régions par les DRASS (Directions régionales des affaires sanitaires et sociales) et dans les départements par les DDASS (Directions départementales des affaires sanitaires et sociales), la tutelle exercée sur les établissements de santé est dorénavant essentiellement le fait des Agences régionales de l'hospitalisation (ARH) et de la Haute Autorité de santé (HAS).

1. Agences régionales de l'hospitalisation (ARH)

Créées par l'ordonnance n° 96-346 du 24 avril 1996 portant réforme de l'hospitalisation publique et privée, les Agences régionales d'hospitalisation (ARH) ont pour mission de « définir et de mettre en œuvre la politique régionale de l'offre de

soins hospitaliers, d'analyser et de coordonner l'activité des établissements de santé publics et privés, de contrôler leur fonctionnement et de déterminer leurs ressources » (Art. L. 6115-1 du Code de la santé publique). Associant les services déconcentrés de l'État et l'assurance maladie, ces ARH ont pour vocation d'être l'interlocuteur privilégié des directeurs des établissements de santé publics et privés de la région.
Placées sous la tutelle des ministres chargés de la santé et de la sécurité sociale, elles sont constituées sous forme de groupement d'intérêt public auquel participent l'État, la caisse régionale d'assurance maladie et l'union régionale des caisses d'assurance maladie.

2. Haute Autorité de santé (HAS)

Autorité publique indépendante à caractère scientifique, la Haute Autorité de santé (HAS) est chargée de :

- procéder à l'évaluation périodique du service attendu des produits, actes et prestations de santé et du service qu'ils rendent ; à ce titre, elle abrite la commission de la transparence et la commission des produits et prestations remboursables ;
- élaborer les guides de bon usage des soins ou les recommandations de bonne pratique, procéder à leur diffusion et contribuer à l'information des professionnels de santé et du public dans ces domaines ;
- établir et mettre en œuvre les procédures d'évaluation des pratiques professionnelles et d'accréditation des professionnels et des équipes médicales ;
- établir et mettre en œuvre les procédures de certification des établissements de santé ;
- participer au développement de l'évaluation de la qualité de la prise en charge sanitaire de la population par le système de santé.

Au sein de la HAS a été instaurée une commission « Certification des établissements de santé » chargée de mener à bien la procédure d'accréditation, appelée certification depuis la loi du 13 août 2004 (Loi n° 2004-810 du 13 août 2004 relative à l'assurance maladie).

B. Exercice de la tutelle

1. Planification sanitaire

a) Principes de la planification sanitaire

Mise en place en 1970, la planification sanitaire concerne non seulement les équipements et matériels lourds, mais aussi les structures de soins alternatives à l'hospitalisation et certaines activités de soins. L'un des instruments de cette planification sanitaire est le schéma d'organisation sanitaire qui a pour objet « de prévoir et susciter les évolutions nécessaires de l'offre de soins préventifs, curatifs et palliatifs afin de répondre aux besoins de santé physique et mentale. Il inclut également l'offre de soins pour la prise en charge des femmes enceintes et des nouveau-nés. » (Art. L. 6121-1 du Code de la santé publique). L'objectif est donc d'adapter au mieux l'offre de soins en fonction de la demande. Pour cela, les schémas d'orga-

nisation sanitaire visent à susciter des adaptations nécessaires ainsi que des coordinations notamment entre établissements de santé. Par ailleurs, on tient également compte de la complémentarité entre médecine de ville, secteur médico-social, secteur social et établissements de santé. Les besoins de santé des populations et leur évolution sont évalués à partir de données démographiques et épidémiologiques, en tenant compte des progrès des techniques médicales et après une analyse quantitative et qualitative de l'offre de soins existante.
Ces schémas d'organisation sanitaire sont définis pour des territoires de santé qui peuvent être, selon les activités et les équipements, infrarégionaux, régionaux, interrégionaux ou nationaux. Les limites de ces territoires de santé sont définies par le directeur de l'Agence régionale de l'hospitalisation pour les activités relevant du schéma régional d'organisation sanitaire et par le ministre de la Santé pour ceux qui relèvent d'un schéma interrégional ou national.

b) Activités et équipements soumis à autorisation

Les projets relatifs à la création d'établissements de santé, la création, la conversion et le regroupement de certaines activités de soins, y compris sous la forme d'alternatives à l'hospitalisation, et l'installation d'équipements matériels lourds sont soumis à autorisation du directeur de l'ARH.

Tableau 2. Activités de soins soumises à autorisation de l'ARH

• Médecine • Chirurgie • Gynécologie-obstétrique, néonatologie, réanimation néonatale • Psychiatrie • Soins de suite • Rééducation et réadaptation fonctionnelles • Soins de longue durée • Transplantations d'organes et greffes de moelle osseuse • Traitement des grands brûlés • Chirurgie cardiaque • Activités interventionnelles sous imagerie médicale, par voie endovasculaire, en cardiologie • Neurochirurgie • Activités interventionnelles par voie endovasculaire en neuroradiologie • Médecine d'urgence • Réanimation • Traitement de l'insuffisance rénale chronique par épuration extrarénale • Activités cliniques d'assistance médicale à la procréation, activités biologiques d'assistance médicale à la procréation, activités de recueil, traitement, conservation de gamètes et cession de gamètes issus de don, activités de diagnostic prénatal ; • Traitement du cancer

Tableau 3. Équipements matériels lourds soumis à autorisation

• Caméra à scintillation munie ou non de détecteur d'émission de positons en coïncidence, tomographe à émissions, caméra à positons • Appareil d'imagerie ou de spectrométrie par résonance magnétique nucléaire à utilisation clinique • Scanographe à utilisation médicale • Caisson hyperbare • Cyclotron à utilisation médicale

c) Contrats d'objectifs et de moyens

Les établissements de santé, publics et privés, signent avec l'ARH des contrats d'objectifs et de moyens d'une durée de cinq ans. Outils de la planification hospitalière ces contrats déterminent les orientations stratégiques des établissements. Ils définissent les objectifs en matière de qualité et de sécurité des soins, et décrivent les transformations que les établissements s'engagent à opérer dans leurs activités et dans leurs actions de coopération.

2. Qualité des soins : la certification des établissements

Qu'ils soient publics ou privés, l'ensemble des établissements de santé doivent se soumettre à une procédure de certification, auparavant dénommée accréditation. Il s'agit d'une procédure externe d'évaluation, conduite par la HAS qui vise à porter une appréciation sur la qualité de l'établissement à l'aide d'indicateurs, de critères et de référentiels portant sur les procédures, les bonnes pratiques cliniques et les résultats des différents services.

III. Pharmacie à usage intérieur et pharmacien hospitalier

A. Champ d'activité de la pharmacie à usage intérieur

1. Notion d'usage intérieur

a) Définition de l'usage intérieur

L'article L. 5126-1 du Code de la santé publique affirme la notion d'usage intérieur : « L'activité des pharmacies à usage intérieur est limitée à l'usage particulier des malades dans les établissements de santé ou médico-sociaux où elles ont été constituées ou qui appartiennent à un syndicat interhospitalier ». Ainsi, la loi définit cette notion d'usage intérieur et confère à la pharmacie à usage intérieur le soin de répondre aux besoins pharmaceutiques de l'établissement où elle a été créée (*cf. infra* : Missions des pharmacies à usage intérieur).

b) Dérogations à l'usage intérieur

Ces dérogations à l'usage intérieur présentent toutes un caractère exceptionnel et nécessaire, motivées pour des raisons de santé publique et soumises à autorisation.

■ *Rétrocession*

Il s'agit de la vente au détail de certains médicaments à des malades non hospitalisés. Ces médicaments rétrocédés doivent figurer sur une liste arrêtée par le ministre chargé de la santé après avis du directeur de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Les raisons motivant l'inscription d'un médicament sur la liste des médicaments rétrocédables tiennent notamment à des contraintes de distribution, de dispensation ou d'administration, à la sécurité d'approvisionnement ou à la nécessité d'effectuer un suivi de leur prescription ou de leur délivrance. Ils

doivent être inscrits sur une liste de substances vénéneuses et dès lors soumis à prescription médicale et ne doivent pas être réservés à l'usage hospitalier. Seuls certains établissements de santé disposant d'une pharmacie à usage intérieur sont autorisés à mettre en place une activité de rétrocession.

■ *Approvisionnement d'autres établissements*

La pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé peut être autorisée par le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé à distribuer des produits, substances ou médicaments sur lesquels sont réalisées des recherches biomédicales à d'autres pharmacies à usage intérieur d'établissements de santé où la recherche est réalisée.

De même, s'il n'y a pas d'autres sources d'approvisionnement possibles pour un médicament ou un produit déterminé, un établissement de santé public ou un établissement privé participant au service public hospitalier peut être autorisé à approvisionner d'autres pharmacies à usage intérieur. Dans ce cas, l'autorisation est délivrée par le directeur de l'ARH, après avis du directeur régional des affaires sanitaires et sociales. Il peut être passé outre cette autorisation s'il s'agit d'un besoin impératif et immédiat du produit considéré et sous réserve d'en informer au plus vite le représentant de l'État et le directeur régional des affaires sanitaires et sociales. Enfin, les établissements publics de santé peuvent être autorisés à vendre en gros des médicaments non disponibles par ailleurs à des organisations humanitaires ou à l'État pour l'exercice de ses missions humanitaires, et, exceptionnellement, en cas de nécessité, pour une durée limitée, en l'absence d'autre source de distribution possible, à vendre au détail des médicaments.

2. Missions des pharmacies à usage intérieur

D'une façon générale, les pharmacies à usage intérieur sont chargées :

- d'assurer la gestion, l'approvisionnement, la préparation, le contrôle, la détention et la dispensation des médicaments et autres produits relevant du monopole pharmaceutique, ainsi que des dispositifs médicaux stériles et des médicaments expérimentaux ;
- de mener ou de participer à toute action d'information sur ces médicaments et autres produits ou objets, ainsi qu'à toute action de promotion, et d'évaluation de leur bon usage, de contribuer à leur évaluation et de concourir à la pharmacovigilance et à la matériovigilance, à toute action de sécurisation du circuit du médicament et des dispositifs médicaux stériles ;
- de mener ou de participer à toute action susceptible de concourir à la qualité et à la sécurité des traitements et des soins dans les domaines relevant de la compétence pharmaceutique.

a) Approvisionnement et dispensation de produits pharmaceutiques

Il convient de noter que, dans la mesure où l'engagement des dépenses dans un établissement de santé est de la responsabilité du directeur de cet établissement, le pharmacien hospitalier n'est habilité qu'à assurer l'approvisionnement en produits de santé (spécialités pharmaceutiques avec AMM ou sous ATU, mais aussi produits autres que les médicaments tels que les dispositifs médicaux stériles ou les produits diététiques destinés à des fins médicales spéciales). Outre les spécialités pharmaceutiques autorisées et autres produits du monopole pharmaceutique, rappelons que la

pharmacie à usage intérieur se voit également confier la gestion (approvisionnement, détention et dispensation) des médicaments en expérimentation dans l'établissement. La dispensation de ces produits peut se définir comme étant l'acte pharmaceutique associant la délivrance des produits à l'analyse pharmaceutique de l'ordonnance, la préparation éventuelle des doses à administrer et la mise à disposition d'informations sur les produits délivrés.
Le pharmacien hospitalier est aidé dans cette mission par la Commission du médicament et des dispositifs médicaux stériles (COMEDIMS). Une telle commission doit être constituée dans chaque établissement de santé ; elle participe à la politique du médicament et des dispositifs médicaux stériles ainsi qu'à la lutte contre les affections iatrogènes à l'intérieur de l'établissement. En particulier, elle contribue à l'élaboration de la liste des médicaments et dispositifs médicaux stériles dont l'utilisation est recommandée dans l'établissement ainsi que des recommandations en matière de prescription et de bon usage de ces produits.

b) Réalisation de préparations

Outre des préparations magistrales (médicaments préparés extemporanément en pharmacie, selon une prescription destinée à un malade déterminé), les pharmacies à usage intérieur peuvent également préparer des préparations hospitalières. Il s'agit de médicaments préparés selon les indications de la pharmacopée et conformément aux bonnes pratiques en raison de l'absence de spécialités pharmaceutiques disponibles ou adaptées (très souvent à usage pédiatrique) dans une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé. Ces préparations hospitalières sont donc dispensées aux patients de la pharmacie à usage intérieur ; elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Afssaps.

c) Stérilisation et sous-traitance

Les pharmacies à usage intérieur peuvent assurer la stérilisation de dispositifs médicaux pour leur propre compte mais également pour d'autres établissements voire pour d'autres professionnels de santé ou des directeurs de laboratoire d'analyses de biologie médicale. Toutefois, cette activité de stérilisation réalisée pour le compte d'autres personnes est soumise à autorisation préfectorale délivrée pour une durée déterminée, après avis de l'inspection de la pharmacie et sur la base d'une convention qui fixe les engagements des parties contractantes.

B. Création et gestion des pharmacies à usage intérieur

1. Autorisation de création

La loi précise les structures dans lesquelles peut être créée une pharmacie à usage intérieur : établissements de santé, établissements médico-sociaux (par exemple, les établissements qui accueillent des personnes âgées ou des personnes handicapées) dans lesquels sont traités des malades, les syndicats interhospitaliers et les groupements de coopération sanitaire, les hôpitaux des armées, les installations de chirurgie esthétique, les services départementaux d'incendie et de secours, les établissements pénitentiaires.

La création, le transfert ou la suppression d'une pharmacie à usage intérieur est subordonné à l'octroi d'une autorisation délivrée par le préfet ou le directeur de l'ARH après avis du conseil de l'ordre des pharmaciens et du directeur régional des affaires sanitaires et sociales. Outre le lieu d'implantation de la pharmacie à usage intérieur, l'autorisation d'ouverture mentionne également la réalisation de certaines activités (préparations hospitalières, préparations pour expérimentations, stérilisation, etc.).

2. Pharmacien hospitalier

La gérance d'une pharmacie à usage intérieur est assurée par un pharmacien, qui doit exercer personnellement ses fonctions. Contrairement au pharmacien d'officine qui est tout à la fois gérant et propriétaire de son officine, le pharmacien hospitalier n'est que gérant de la pharmacie à usage intérieur, l'établissement de santé restant propriétaire de la pharmacie.
Toutefois, lorsque les besoins d'un établissement ne justifient pas l'existence d'une pharmacie à usage intérieur, les médicaments et autres produits du monopole pharmaceutique destinés à des soins urgents peuvent être détenus et dispensés sous la responsabilité d'un médecin attaché à l'établissement ou d'un pharmacien ayant passé convention avec l'établissement.

Conclusion

Face au développement des techniques et au progrès des sciences médicales, l'hôpital a connu de profondes mutations. Il ne s'agit plus d'un lieu réservé aux pauvres et aux indigents, mais dorénavant, il est devenu un lieu de haute technicité. Cete évolution technologique de l'hôpital s'est accompagnée, depuis plusieurs décennies, de nombreuses réformes. En effet, l'hôpital représente plus de 40 % de la consommation de soins et de biens médicaux, financé principalement par l'assurance maladie. Dans le contexte de maîtrise des dépenses de santé, ces réformes ont porté sur son organisation interne, mais également sur son mode de financement tout en veillant à la qualité des soins et à l'accueil du patient.

L'essentiel de la question

Tous les établissements de santé doivent assurer les examens de diagnostic, surveillance et traitement des malades, des blessés et des femmes enceintes. Outre ces missions de base, ils doivent par ailleurs organiser la lutte contre les infections nosocomiales et les affections iatrogènes et mettre en place un dispositif de vigilance couvrant les différents produits de santé.
Certains établissements de santé (tous les établissements publics et certains établissements privés) participent au service public hospitalier. Dès lors, ils doivent, en plus des missions de soins précédemment énumérées, assurer des missions d'enseignement, de recherche et de formation continue, participer au SAMU, à la lutte contre

l'exclusion sociale et aux soins en milieu pénitentiaire. Par ailleurs, ils sont soumis aux obligations suivantes : égalité de tous les malades, continuité de fonctionnement, adaptabilité aux besoins sanitaires du pays. Les établissements publics de santé sont administrés par un conseil d'administration qui réunit des représentants des usagers, du personnel de l'établissement et des élus locaux, et qui définit la politique générale de l'établissement, par un directeur et un conseil exécutif. En matière de financement, depuis 2004 est mise en place la tarification à l'activité qui devrait s'appliquer en 2012 de façon uniforme à tous les établissements privés ou publics. Outre le ministère chargé de la santé (avec la DGS et la DHOS) et ses services déconcentrés, la tutelle sur les établissements de santé est essentiellement le fait des Agences régionales de l'hospitalisation (ARH) et de la Haute Autorité de santé (HAS). Les premières sont chargées de mettre en œuvre au niveau régional la politique de l'hospitalisation tant publique que privée et d'allouer les ressources aux établissements. Quant à la HAS, elle conduit les procédures de certification.
Dans les établissements de santé peut être créée une pharmacie à usage intérieur (PUI) destinée, sauf exception, à l'usage des malades hospitalisés dans l'établissement où elle a été implantée. L'ouverture, de même que la suppression ou le transfert d'une PUI est soumis à autorisation. Ces PUI ont pour missions principales d'assurer l'approvisionnement de l'établissement en médicaments, et autres produits du monopole pharmaceutique, la réalisation de préparations magistrales et de préparations hospitalières ainsi que la stérilisation des dispositifs médicaux.

Pour en savoir plus

- Dupont M., Esper C., Paire C. *Droit hospitalier*. Dalloz, 5e édition, 2005.
- Moreau J., Truchet D. *Droit de la santé publique*. Mémentos Dalloz, 6e édition, 2004.

Indicateurs de santé

M. HENRY-AMAR, Service de recherche clinique,
centre François Baclesse, Caen.
P. PERNET, Service de Biochimie A, Hôpital Saint-Antoine, Paris.

L'épidémiologie est définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS – 1968) comme « l'étude de la distribution des maladies et des invalidités dans les populations humaines, ainsi que des influences qui déterminent cette distribution ».
Les phénomènes de santé observés (décès, maladies, facteurs de risque...) sont mesurés au moyen de variables dont l'étude statistique (taux, rapports, fréquences ou moyennes) définit des indicateurs de santé. Ils permettent de décrire l'état de santé de la population, de suivre son évolution et de pouvoir effectuer des comparaisons entre différentes populations.
Toutefois, la mesure de l'état de santé d'une population ne peut se résumer à l'exploitation d'indicateurs épidémiologiques. La description de ses caractéristiques sociologiques, démographiques, économiques et culturelles participe au bilan de la situation. Et la confrontation des indicateurs de perception (obtenus auprès des usagers ou des professionnels de la santé) et des indicateurs épidémiologiques permet de déterminer des priorités sanitaires en fonction de l'importance accordée à certains facteurs (fréquence, gravité, conséquences économiques et sociales...). Classiquement, on distingue les indicateurs de l'état de santé, centrés sur la maladie et les personnes étudiées, et les indicateurs des déterminants de santé qui étudient les facteurs extérieurs qui entraînent une modification de l'état de santé (le climat par exemple).

I. Espérance de vie

L'espérance de vie est un indicateur fondamental de santé publique, très souvent mis en avant, mais qui, certes intéressant, ne rend pas compte de l'état de santé d'une population.
L'*espérance de vie* se définit comme le nombre d'années qui resteraient à vivre à une personne d'un âge donné si elle était soumise au risque de mortalité subi par les populations des âges supérieurs pour une période de référence annoncée (y compris pour les projections). Le plus souvent, l'espérance de vie est calculée à la naissance mais il est évident que les espérances de vie à 60 ans (âge de la retraite), à 75 ans et à 85 ans (âge d'entrée en établissement d'hébergement collectif) intéressent particulièrement la société.

A. Espérance de vie à la naissance

L'espérance de vie à la naissance (ou durée moyenne de vie) est la moyenne des âges au décès d'une génération (définie comme l'ensemble des personnes nées la même année), ou encore du nombre moyen d'années qu'un nouveau-né de cette génération a vécu. Cet indice synthétique, issu des tables de mortalité, ne peut être calculé que lorsque tous les membres d'une même génération sont décédés. En pratique, on utilise des projections pour estimer l'espérance de vie des générations les plus récentes.
L'espérance de vie à la naissance connaît des progrès considérables. Il n'y a pas grand-chose de commun entre les espérances de vie de 2005 par sexe (près de 77 ans pour les hommes, plus de 84 ans pour les femmes) et celles du début du XXe siècle (environ 45 ans pour les hommes et 50 ans pour les femmes).

L'augmentation de l'espérance de vie à la naissance a été provoquée tout d'abord par la réduction de la mortalité infantile et celle de la mortalité des jeunes adultes ; elle a été ensuite la conséquence de la diminution de la mortalité aux âges élevés, surtout depuis les années cinquante. Depuis 1900, l'espérance de vie des populations des pays industrialisés a gagné environ 33 ans. L'accroissement de l'espérance de vie est sensible s'agissant des dernières décennies, même si l'on observe un certain ralentissement depuis une trentaine d'années (*tab. 1*).

Tableau 1. Évolution de l'espérance de vie, en années, à la naissance en France, par sexe, de 1789 à 2006 *(source Insee)*

Sexe	1789	1900	1955	1980	1990	2000	2006*
Masculin	28	45	65	70,2	72,7	75,3	77,2
Féminin	28	49	72	78,4	80,9	82,8	84,1

*Projection

Environ huit ans ont été gagnés entre 1980 et 2006. La différence entre les espérances de vie féminine et masculine est sensible, rendant compte du très important phénomène de surmortalité masculine, de l'ordre de huit ans, qui n'est pas prêt à disparaître. La surmortalité masculine en France est l'une des plus élevées des pays industrialisés. Elle devrait se réduire à partir du deuxième quart du XXIe siècle.

L'espérance de vie varie également selon les catégories sociales et professionnelles de même qu'elle varie d'une région à une autre. Ainsi rend-elle bien compte des différences en matière de niveau d'éducation et de mode de vie (notamment s'agissant des comportements à risque : tabagisme, alcoolisme).

L'espérance de vie à un âge donné pour l'année considérée est le nombre moyen d'années supplémentaires que les personnes pourraient vivre si elles étaient soumises le restant de leur vie aux conditions de mortalité par âge de l'année considérée.

B. Espérance de vie aux âges élevés

L'espérance de vie aux âges élevés a fortement progressé. À 60 ans, elle n'était, au début du XXe siècle, que de 13 ans pour les hommes et d'un peu moins de 15 ans pour les femmes. Elle est respectivement aujourd'hui de plus de 21 ans et de près de 27 ans… et en 2020, elle devrait être de l'ordre de 23 ans pour les hommes et de 28 ans pour les femmes, soit pour le sexe féminin, près du double de ce qui était constaté cent vingt ans plus tôt. À 85 ans, alors même que la situation des Françaises (avec celle des Japonaises) peut être qualifiée d'exceptionnelle, les progrès attendus continuent d'être importants : environ six ans et demi d'espérance de vie actuellement, un an de plus en 2020 ; le progrès est un peu moins net pour le sexe masculin (un peu plus de cinq ans et moins de six ans) (*tab. 2*). En conséquence, plus une personne avance en âge, plus sa durée de vie globale (nombre d'années vécues à l'âge x + espérance de vie à l'âge x) augmente.

L'écart entre les espérances de vie féminine et masculine restera important et ne diminuera pas avant le deuxième quart du XXIe siècle. À 60 ans, l'écart entre les

Tableau 2. Évolution de l'espérance de vie, en années, à 60, 75 et 85 ans, par sexe, de 1950 à 2020 *(source Insee)*

Sexe	Âge	1950	1980	1990	2000	2010*	2020*
Masculin	60	15,4	17,3	19	20,3	21,6	22,8
	75	7	8,3	9,4	10,1	10,8	11,6
	85	3,7	4,5	4,9	5,2	5,6	5,9
Féminin	60	18,4	22,4	24,2	25,7	27,1	28,4
	75	8,4	10,7	12	13	14	14,9
	85	4,4	5,4	6	6,5	7,1	7,6

*Projection

espérances de vie masculines selon les catégories sociales ou professionnelles en positions extrêmes (professeurs d'une part et ouvriers non qualifiés d'autre part) est d'environ cinq ans et n'a pas tendance à diminuer. Les différences entre régions en 2004 sont également sensibles, de l'ordre de quatre ans pour le sexe masculin : Midi-Pyrénées (77,8), d'une part, et Nord-Pas-de-Calais (73,6), d'autre part.

C. Espérance de vie sans incapacité

L'espérance de vie sans incapacité (encore appelée espérance de vie ajustée sur la santé) est un indicateur synthétique de l'état de santé de la population. Il distingue les années vécues en incapacité du fait d'affections handicapantes. Cet indicateur intègre des données sur la mortalité, sur le placement dans un établissement de santé à long terme et sur les limitations des activités au sein de la population. Sa mesure reste difficile car elle se heurte à divers écueils, dont la notion d'incapacité elle-même (incapacité sévère, incapacité modérée).

Pour calculer l'espérance de vie sans incapacité, des poids (valeurs relatives) sont attribués à quatre états de santé. Ces états de santé sont, par ordre décroissant d'importance (de poids) : aucune limitation des activités ; limitation des activités dans les loisirs ou dans les transports ; limitation des activités au travail, à la maison ou à l'école ; placement dans un établissement de soins de santé. Ces unités sont additionnées pour produire une forme d'espérance de vie « ajustée pour la qualité de vie ».

Les années de vie gagnées lors des dernières années, à 60 ans, l'ont été, très largement si ce n'est totalement, sans incapacité sévère. Cependant, même si le nombre moyen d'années à vivre sans incapacité tend à augmenter, l'accroissement des effectifs de la population âgée imposera très vraisemblablement un accroissement de la population âgée dépendante d'ici à 2010 et plus encore en 2020, même dans le scénario dit optimiste. Il y a donc lieu de prévoir un accroissement du nombre de lits de structures d'hébergement collectif et un appel plus large à l'aide à domicile. Il en résulte que la démarche de prévention que l'on annonce comme l'une des grandes priorités du XXI[e] siècle sera de plus en plus une ardente obligation de l'action gérontologique en vue de la réduction des causes d'incapacités et de handicaps.

II. Mortalité

La valeur des statistiques de mortalité est extrêmement variable selon les pays. Dans les pays industrialisés, les dénombrements des décès sont exacts, mais les enregistrements des causes restent très inégaux en dépit d'une classification commune. Dans les pays en développement, le dénombrement des décès, comme celui des autres données d'état civil, est souvent inexact, surtout dans les zones rurales.

Tableau 3. Évolution de la situation démographique de la population française entre 1985 et 2000, exprimée en milliers *(source Insee)*

Années	Population totale	Naissances	Natalité*	Décès	Mortalité*
1985	56 600	796,5	14,1	560,5	9,9
1990	58 171,4	793,9	13,6	534,5	9,2
1995	59 418,7	759,7	12,8	540,4	9,1
2000	60 594,3	808,2	13,3	540,7	8,9
2005	62 818,0	807,8	12,9	538,2	8,6

*Taux pour 1 000 habitants

En France, en 2004, les principales *causes de mortalité* sont, par ordre décroissant d'importance, les cancers, les maladies de l'appareil circulatoire, l'ensemble traumatismes-intoxications-suicides (morts violentes) et les maladies de l'appareil respiratoire *(tab. 4)*.

Tableau 4. Principales causes de mortalité dans la population française en 2004

Causes	Ensemble		Hommes	Femmes
	Nombre	%		
Tumeurs	152 708	30,0	34,5	25,2
Maladies de l'appareil circulatoire	147 323	28,9	26,4	31,7
Morts violentes	37 428	7,3	8,5	6,1
Maladies de l'appareil respiratoire	30 286	5,9	6,1	5,8
Maladies de l'appareil digestif	22 905	4,5	4,7	4,3
Maladies endocriniennes	18 856	3,7	3,1	4,3
Autres causes	99 902	19,6	16,8	22,6
Toutes causes	509 408	100	100	100

En 2004, la mortalité par cancer qui avait augmenté, régresse grâce aux diagnostics plus précoces et au recul des comportements à risque (tabac, alcool, etc). Elle devient néanmoins supérieure à la mortalité par maladie de l'appareil circulatoire qui a plus fortement diminué depuis un demi-siècle grâce aux progrès de la prévention et des traitements.

Parmi les personnes décédées d'une affection de l'appareil circulatoire ou de l'appareil respiratoire, environ 90 % sont âgées de plus de 90 ans ; pour les pathologies

tumorales, les décès des personnes de plus de 65 ans représentent environ 70 % de l'ensemble. Les comparaisons entre sexes montrent que la mortalité liée au cancer est plus fréquente chez l'homme, surtout entre 65 et 79 ans ; la mortalité par affection de l'appareil circulatoire est plus fréquente chez la femme (dans la population générale et après 80 ans).

Les *indices de mortalité* les plus généralement utilisés sont au nombre de cinq :

- le *taux brut* annuel de mortalité est le rapport entre le nombre de décès observés pendant une année et l'effectif de la population exposée au risque de décès pendant la même année. Il est exprimé en pour 100 000 hommes ou femmes ;
- les *taux spécifiques par âge* sont définis de façon similaire : le taux spécifique t_i dans une classe d'âge i est le rapport entre le nombre de décès observés d_i et l'effectif de la population moyenne n_i dans cette classe d'âge, pour la période considérée. Ces taux sont calculés pour 18 classes d'âge quinquennales : 0 à 4 ans, 5 à 9 ans… 80 à 84 ans et la classe d'âge 85 ans et plus ;
- la population française, comme celle de tous les pays industrialisés, vieillit progressivement, et une augmentation régulière des taux bruts entre 1950 et 2000, par exemple, pourrait être en grande partie le reflet de ce vieillissement. Il est donc indispensable de prendre en compte l'effet de l'âge en calculant des taux comparatifs, encore appelés *taux standardisés sur l'âge*. Ces taux n'ont qu'un intérêt comparatif (ils sont alors indispensables) et ne représentent pas, contrairement aux taux bruts, une mesure réelle de l'état de santé de la population à un moment donné.

  Pour prendre en compte l'effet de l'âge, on utilise la structure d'âge d'une population de référence (ou population standard) commune à toutes les années que l'on désire comparer.

  Soit w_i (i = 1 à 18), les proportions de sujets dans chaque classe d'âge de la population de référence,

  et t_i (i = 1 à 18), les taux spécifiques par âge pour une année donnée.

  Le taux pour l'année étudiée, standardisé sur la population de référence, est :

  $$t_s = \Sigma\, w_i\, t_i \text{ avec } i = 1 \text{ à } 18$$

  Pour faciliter les comparaisons internationales, deux populations de références sont généralement utilisées : la population mondiale et la population européenne *(tab. 5)* ;
- la certification des causes de décès est devenue de plus en plus précise depuis plus d'une trentaine d'années du fait de l'amélioration des soins et de la précision des diagnostics, surtout chez les personnes âgées. Une augmentation apparente de la mortalité, pour une cause donnée, pourrait refléter en grande partie l'amélioration de l'enregistrement. Pour pallier cet inconvénient, on a recours au calcul de *taux « tronqués »*, qui ne prennent en compte que certaines classes d'âge. Pour la mortalité par cancer, par exemple, il est classique d'utiliser des taux ne prenant en compte que les sujets âgés de 35 à 64 ans. Ignorer les décès par cancer survenant avant 35 ans est légitime pour la plupart des localisations car ils sont extrêmement rares avant cet âge. À l'inverse, les cancers de l'enfant ou de l'adulte jeune nécessiteraient une étude spécifique ;
- le *taux de mortalité cumulé* jusqu'à l'âge A s'obtient en cumulant jusqu'à cet âge les taux spécifiques par année d'âge. Dans la mesure où ces taux sont fournis par

Tableau 5. Structure d'âge des populations mondiale et européenne de référence ainsi que de la population française (*d'après Waterhouse et coll.,* Cancer incidence in five continents, *vol. III, IARC, Lyon, 1976*)

Classe d'âge	Monde 1976	Europe 1976	France 1990
0-4	120	80	67
5-9	100	70	69
10-14	90	70	66
15-19	90	70	77
20-24	80	70	77
25-29	80	70	76
30-34	60	70	76
35-39	60	70	**76**
40-44	60	70	**72**
45-49	60	70	**51**
50-54	50	70	**51**
55-59	40	60	**54**
60-64	40	50	**51**
65-69	30	40	48
70-74	20	30	23
75-79	10	20	31
80-84	5	10	21
85 +	5	10	15
Total	1 000	1 000	1 000

classe d'âge quinquennale, il faut multiplier par cinq la somme des taux par classe d'âge. Le taux cumulé de 0 à 64 ans est alors estimé de la façon suivante :

$$t_{c\ 0\text{-}64} = \Sigma\ 5 \times t_i = 5\ \Sigma\ t_i \text{ avec } i = 1 \text{ à } 13$$

Une illustration est donnée, pour l'ensemble des décès par cancer en France, dans le *tableau* ci-dessous.

Tableau 6. Taux bruts et taux standardisés (pour 100 000) et taux cumulés (%) de décès par cancer en France (*d'après Hill et coll.,* Évolution de la mortalité par cancer en France 1950-1990, *mise à jour 1986-1990, Statistiques de santé, Inserm, Paris, 1993*)

Année	Standard monde		Standard Europe		Taux cumulé		Taux brut	
	Tous âges		Tous âges		0 à 64 ans		Tous âges	
	H	F	H	F	H	F	H	F
1986	202,29	89,14	303,36	132,53	10,28	4,61	299,7	183,4
1987	203,36	89,57	305,74	133,08	10,20	4,59	303,8	185,6
1988	202,27	89,15	304,52	132,83	10,20	4,56	305,7	187,4
1989	201,68	88,59	303,24	131,92	10,14	4,54	307,9	188,3
1990	198,32	86,56	298,16	129,04	10	4,46	306,2	185,8

La structure d'âge de la population mondiale de référence étant beaucoup plus jeune que celle de la population européenne de référence, cela se traduit par une différence considérable entre les taux standardisés sur l'une et l'autre population. En revanche, la structure d'âge de la population française étant peu différente de celle de la population standard européenne, les écarts entre les taux bruts et standardisés sont peu importants. Les valeurs des taux cumulés indiquent en 1990 que 10 % des Français et 4,5 % des Françaises développent un cancer avant l'âge de 65 ans.
D'autres indices de mortalité peuvent être utilisés comme ceux relatifs à l'enfance et à la grossesse :

- *taux de mortalité infantile,* rapport entre le nombre total de décès entre 0 et 364 jours révolus de vie et le nombre de naissances vivantes pour une période donnée ;
- *taux de mortalité néonatale*, rapport entre le nombre total de décès entre 0 et 27 jours révolus de vie et le nombre de naissances vivantes pour une période donnée ;
- *taux de mortalité néonatale* précoce, rapport entre le nombre total de décès entre 0 et 6 jours révolus de vie et le nombre de naissances vivantes pour une période donnée ;
- *taux de mortalité postnéonatale*, rapport entre le nombre total de décès entre 28 et 364 jours révolus de vie et le nombre de naissances vivantes pour une période donnée ;
- *taux de mortinatalité,* rapport entre le nombre de morts fœtales après la 28e semaine d'aménorrhée et le nombre total de naissances (naissances vivantes et mort-nés) pour une période donnée ;
- *taux de mortalité périnatale,* rapport entre la somme des morts-nés après 28 semaines d'aménorrhée (mortinatalité) et des enfants décédés pendant la première semaine (mortalité néonatale précoce), rapporté au nombre total de naissances pour une période donnée ;
- *taux de mortalité maternelle*, rapport entre le nombre de décès en cours de grossesse (quel que soit le terme) ou dans les 42 jours suivant l'accouchement d'une cause quelconque liée à la grossesse ou à ses soins, rapporté au nombre total de naissances vivantes pour une période donnée ;

ou ceux spécifiques d'une cause de décès donnée :

- *taux proportionnel de mortalité pour une cause donnée.* Il s'agit du rapport entre le nombre total de décès dans la population pour la cause considérée et l'effectif total des décès de la population durant une période donnée. Les maladies cardiovasculaires représentent ainsi en 2004, 29 % des décès, et quatre causes (maladies circulatoires, cancers, morts violentes et maladies respiratoires) représentent 72 % des décès ;
- *taux de létalité.* Il mesure la proportion de malades atteints d'une maladie qui vont décéder de celle-ci. Il s'agit du rapport entre le nombre total de décès observés dans la population pour la maladie et le nombre de nouvelles personnes atteintes de la maladie durant une période donnée.

La *mortalité prématurée* est par convention l'ensemble des décès survenus entre 1 et 64 ans. Le taux de mortalité prématurée est le rapport entre le nombre total de décès survenus avant l'âge de 65 ans et l'effectif de la population âgée de moins de

65 ans pour une période donnée. Certaines causes de décès à l'origine de la mortalité prématurée peuvent être considérées comme « évitables », c'est-à-dire qu'en l'état actuel des connaissances médicales et compte tenu des capacités de prise en charge du système de soins français, elles ne devraient pas entraîner de décès avant 65 ans. Parmi ces *décès évitables*, certains sont liés aux habitudes de vie et aux comportements (tabac, alcool, accidents de la route…) et d'autres sont liés au fonctionnement du système de soins au niveau curatif ou préventif.
La liste des causes de décès évitables a été établie par la Fédération nationale des observatoires régionaux de la santé (FNORS [1]) en s'inspirant à la fois des travaux européens, et des travaux menés au sein de l'Inserm. Basée sur la classification simplifiée « S9 » de l'Inserm, elle inclut les décès avant 65 ans par typhoïde, tuberculose, tétanos, Sida, cancers de la cavité buccale et du pharynx, de l'œsophage, du larynx, de la trachée, des bronches et du poumon, de la peau, du sein, de l'utérus, lymphome de Hodgkin, leucémies, psychose alcoolique et cirrhose du foie, cardiopathies rhumatismales chroniques, maladies hypertensives, cardiopathies ischémiques, maladies vasculaires cérébrales, grippe, asthme, ulcères, mortalité maternelle, accidents de la circulation, chutes accidentelles et suicides.
Les travaux européens classent les décès « évitables » en deux groupes selon les modalités d'actions capables d'en diminuer la fréquence. Le premier groupe distingue les décès qui pourraient être évités essentiellement par une action sur les facteurs de risque individuels, par exemple décès par cancer du poumon, alcoolisme, ou encore accident de la circulation. Le second groupe comprend les décès évitables principalement grâce à une meilleure prise en charge par le système de soins (y compris dans le cadre d'actions de dépistage), éventuellement renforcée par une action sur certains comportements individuels, par exemple décès par tuberculose, cancer du sein ou maladies hypertensives.

III. Morbidité

La morbidité concerne l'évaluation statistique du nombre de malades dans une population. Pour une maladie donnée, les indices de morbidité sont définis de la même façon que ceux se rapportant à la mortalité : taux brut, taux spécifique par âge, taux standardisé sur l'âge, taux tronqué et taux cumulé.
On distingue cependant deux situations particulières : celle où l'on s'intéresse uniquement aux nouveaux cas de la maladie M survenant dans un espace-temps donné, et celle où tous les cas de cette maladie sont répertoriés.
Lorsque seuls les nouveaux cas d'une maladie donnée sont considérés, on parle d'*incidence*. Au contraire, lorsque tous les cas de cette maladie sont l'objet de l'étude, on parle de *prévalence*. Il existe un rapport direct entre incidence et prévalence qui dépend de la durée pendant laquelle perdure la maladie M. Ainsi, pour une maladie aiguë de durée courte comme la grippe (une grippe dure en moyenne entre 7 et 10 jours), le taux de prévalence est égal au taux d'incidence. Il en va dif-

1. www.fnors.org

féremment pour une maladie chronique dont la durée peut s'étendre sur plusieurs mois ou années, et donc « traverser » des périodes d'intérêt (l'année en général) successives. Ainsi, la prévalence peut être exprimée sur un intervalle de temps ou de manière instantanée à un instant donné.
Le schéma ci-dessous illustre les différentes trajectoires possibles pour un sujet atteint d'une maladie M.

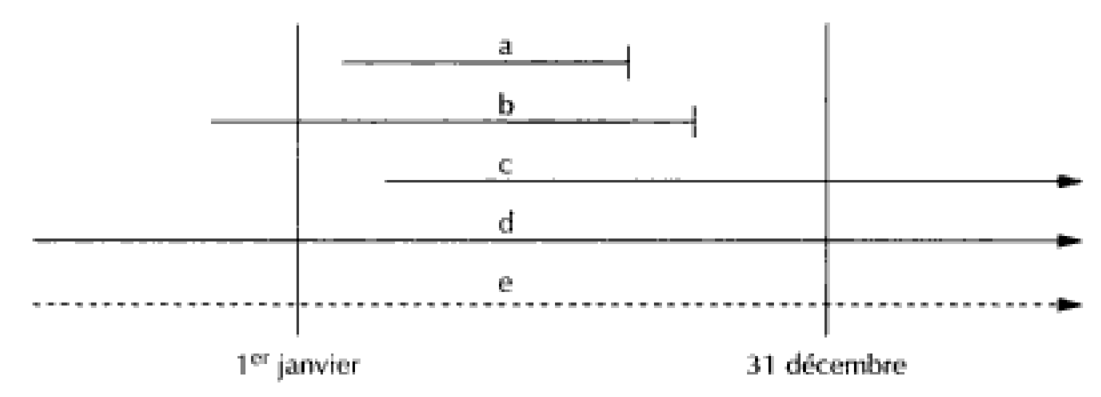


Figure 1. Trajectoires possibles d'un sujet atteint d'une maladie donnée au cours du temps

Soit N la taille de la population étudiée, N = a + b + c + d + e
Le sujet **a** a développé la maladie M au cours de la période d'intérêt, entre le 1er janvier et le 31 décembre de l'année A ; il en guérit au cours de cette même année. Le sujet **b** a développé sa maladie avant le 1er janvier de l'année A et en guérit au cours de la période d'intérêt. Le sujet **c** est atteint de la maladie M au cours de l'année A et est toujours malade au 31 décembre. Enfin, le sujet **d**, qui a développé la maladie M avant le 1er janvier, est toujours malade au 31 décembre de l'année A.
Les sujets **a** et **c** représentent les cas incidents de la maladie M ; les sujets **a**, **b**, **c** et **d** représentent les cas prévalents ; les sujets **e** sont, eux, indemnes de la maladie M au cours de la période étudiée.
Ainsi, l'incidence **I** est définie comme :

$$I = (a + c)/N$$

Et la prévalence **P** comme :

$$P = (a + b + c + d)/N$$

Si, au lieu d'en guérir, les cas décèdent de la maladie, le rapport M = (a + b)/N est égal à la mortalité de la maladie M au cours de la période au sein de la population étudiée. Lorsqu'une population est stable, que l'incidence instantanée de la maladie est faible ou constante, alors la prévalence est égale au produit du taux d'incidence par la durée de la maladie.
En reprenant l'exemple du cancer, pour lequel la France dispose de 10 registres départementaux de plus de dix années d'activité, il est possible, sous certaines conditions, de produire des estimations France entière de l'incidence, globalement, par sexe et par âge quinquennal (*tab. 7, fig. 2*). Ainsi, on observe une surincidence du cancer chez l'homme à partir de 55 ans. Chez les hommes, 50 % des cancers sont des cancers de la prostate, du poumon ou des cancers colorectaux. Chez la femme, les cancers du sein représentent un tiers de tous les cancers et les cancers colorectaux, 15 %.

Tableau 7. Incidence estimée pour 100 000 personnes-années par tranche d'âge et par sexe, en France, en 2000 : toutes localisations (*d'après Francim, 2003*)

Âge	Hommes	Femmes	Âge	Hommes	Femmes	Âge	Hommes	Femmes
0-4	17,9	13,2	30-35	62	93,3	60-64	1 369,2	795,9
5-9	17,9	13,2	35-39	100,8	161,4	65-69	2 015,2	919,3
10-14	17,9	13,2	40-44	186,3	267,3	70-74	2 643	1 042,9
15-19	20,7	16,7	45-49	353,3	412,6	75-79	2 983,9	1 182,7
20-24	30	27,7	50-54	575	534,5	80-84	3 148,1	1 267,7
25-29	42,8	51,9	55-59	910,8	662,4	85 +	2 975,4	1 284,9

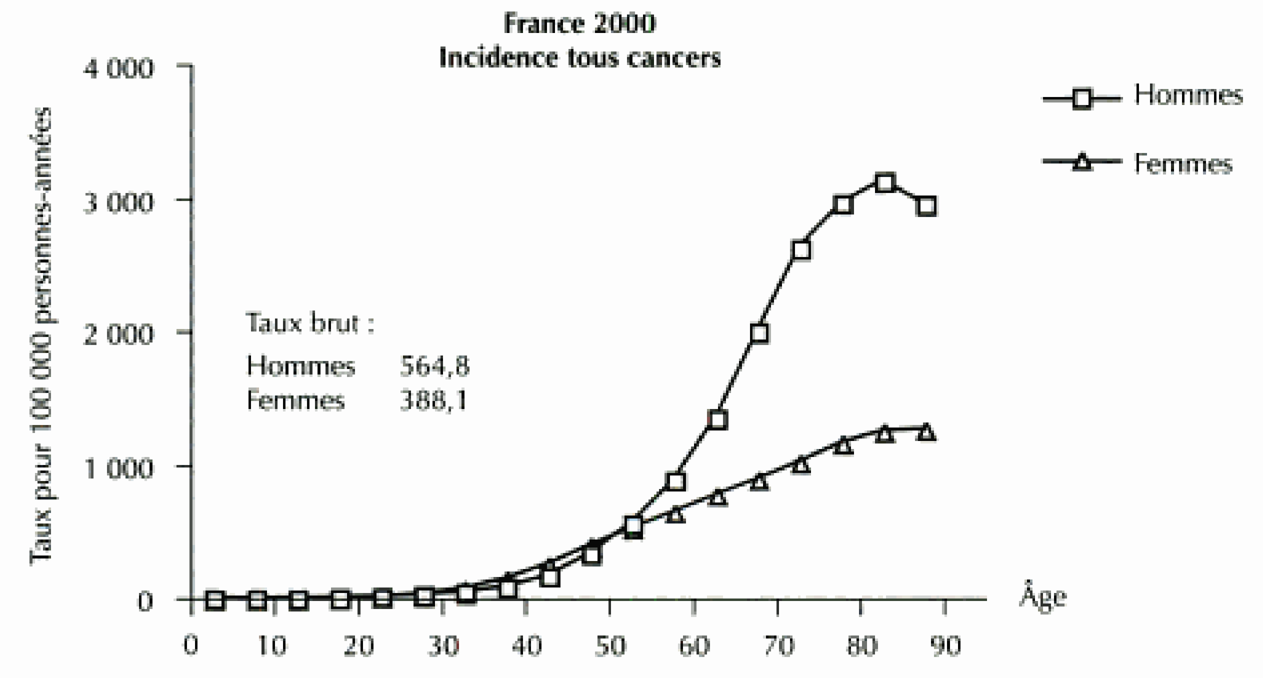


Figure 2. Incidence estimée pour 100 000 personnes-années par tranche d'âge et par sexe, en France, en 2000 : toutes localisations (*d'après Francim, 2003*)

Comme pour la mortalité, les taux standardisés sur une population de référence permettent une comparaison entre pays pour une période donnée par exemple, ou permettent d'analyser, pour un pays donné, l'évolution de l'incidence d'une maladie au cours du temps. Ainsi, l'incidence des cancers, toutes localisations confondues, a crû de 27 % entre 1980 et 2000, soit un taux annuel moyen d'accroissement de + 1,31 % chez l'homme. Chez la femme, ces valeurs sont respectivement de + 31 % et 1,36 % (*tab. 8*). Pendant la même période, les taux de mortalité ont baissé de 7 % chez l'homme et de 10 % chez la femme. Ces dernières années, on observe une diminution de la mortalité par cancer.

Des tableaux et figures similaires peuvent être établis pour d'autres pathologies à condition que des données de population soient disponibles. Ces données sont dépendantes de l'existence de registres de population qui, en France, sont peu nombreux et surtout ne couvrent pas tous l'ensemble de la population métropolitaine. Citons l'existence des registres de cancer, de malformations congénitales, de cardiopathies ischémiques, du diabète insulino-dépendant de l'enfant, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des accidents vasculaires cérébraux, etc.

Tableau 8. Incidence estimée et mortalité par cancer en France par année et par sexe (standardisés monde pour 100 000 personnes-années) : toutes localisations (*d'après Francim, 2003*)

		Année					
		1980	1985	1990	1995	2000	TE*
Incidence	Homme	275,6	287,3	302,2	321,2	349,4	+ 1,31
	Femme	173	183,8	196,3	210,3	226,3	+ 1,36
Mortalité	Homme	202,2	197,2	193,2	189,9	187,4	– 0,34
	Femme	92	88,9	86,4	84,3	83,1	– 0,46

*Taux annuel moyen d'accroissement 1980-2000 (en %)

En l'absence de registres, les estimations de l'incidence d'une pathologie peuvent être faites à partir d'enquêtes menées auprès d'un échantillon représentatif de la population cible. Ces enquêtes sont difficiles, souvent biaisées (taux de participation peu important), et leur précision limitée par le nombre de personnes interrogées.

IV. Qualité de vie

La qualité de vie est un terme qui apparaît aux États-Unis au cours des années soixante. Il s'agit d'une notion subjective où le vécu est apprécié à travers différents domaines. La notion de qualité de vie est donc multidimensionnelle, elle fait intervenir l'autonomie physique, l'absence de symptômes physiques, un bien-être psychologique, spirituel et social, l'accomplissement de soi… La qualité de vie peut aussi se définir comme la satisfaction aux besoins des personnes : besoin d'accomplissement, réalisation de soi, appartenance sociale, besoin de sécurité et « besoin » physiologique. Shumaker (1990) parle de satisfaction générale de la vie qu'a un individu et son sens du bien-être personnel. Cella (1988) évoque la notion de satisfaction appréciée par le malade en comparaison de ce qu'il perçoit comme possible ou idéal.

Il apparaît donc que le concept de qualité de vie est très subjectif et dépend des valeurs socioculturelles. En 1993, l'OMS insiste sur la notion de perception : « La qualité de vie est définie comme la perception qu'un individu a de sa place dans la vie, dans le contexte de la culture et du système de valeurs dans lequel il vit, en relation avec ses objectifs, ses attentes, ses normes et ses inquiétudes. C'est un concept très large qui peut être influencé de manière complexe par l'état physique du sujet, son état psychologique et son niveau d'indépendance, ses relations sociales et sa relation aux éléments essentiels de son environnement. »

De Haes (1985) parle d'une évaluation subjective de la vie comme un tout où jouent les facteurs personnels et le faire-face. Les cliniciens ont cherché une approche plus opérationnelle et pratique de façon à concevoir une mesure de cet état qualitatif. Cette mesure leur est apparue nécessaire pour appréhender l'impact de

la maladie et des traitements sur la vie des malades, surtout en matière de recherche clinique. De leur côté, les spécialistes de santé publique et les économistes recherchent une approche encore plus globale avec le souhait de mesurer la qualité de vie de groupes de populations saines ou malades, voire d'arriver à une appréciation de la durée de vie pondérée par la qualité de vie. Enfin, chacun de nous, bien-portant ou malade, a une notion individuelle de la qualité de vie avec ses désirs, ses souhaits, sa satisfaction et le but à atteindre. Apparaît donc, sous un même vocable, une interprétation très variable du concept.

A. Apprécier la qualité de vie

La qualité de vie peut se fonder sur des éléments objectifs (autonomie, symptômes, aspects matériels, diminution de sécurité...) et subjectifs (aspects psychologiques, perception des différents domaines de la qualité de vie) qui constituent les deux grands axes de mesure. L'appréciation de la qualité de vie est donc théoriquement différente d'une mesure de santé. La mesure de la qualité de vie ne se limite pas non plus à celle d'une mesure d'autonomie (échelle de Karnofsky, échelle OMS) ou de la durée de vie sans symptômes de toxicité liés au traitement et sans rechute (indicateur Twist, Gelber, 1986).

La qualité de vie ne peut être appréciée que par le sujet lui-même et non par un tiers (médecin, soignant, enquêteur), exception faite des cas où l'état cognitif du sujet ne le permet pas. Deux méthodes sont possibles : l'entretien psychologique et les outils psychométriques. L'entretien psychologique est riche et permet d'aborder tous les aspects de la qualité de vie ; il est cependant difficile à standardiser et impossible à appliquer à grande échelle. Les outils psychométriques sont composés de questionnaires à réponses fermées de type dichotomique (non/oui), de type qualitatif ordonné en intensité (non, un peu, beaucoup... énormément) ou en fréquence. La réponse à la question peut également se présenter sous forme d'une échelle visuelle analogique (ligne horizontale de 10 centimètres sur laquelle le sujet doit se situer entre deux extrémités, schématisant les deux situations extrêmes du domaine à explorer).

Un outil psychométrique idéal doit prendre le sujet comme sa propre référence, explorer et analyser tous les domaines qui composent la qualité de vie, pondérer chacun des domaines les uns par rapport aux autres en fonction de leur importance pour chaque individu, apprécier la satisfaction et le but à atteindre pour chaque domaine et chaque sujet. Il faut également tenir compte des modifications des référentiels au cours du temps. Un tel outil est extraordinairement complexe et en pratique, difficile à utiliser (Dazord, 1995).

De façon pragmatique, plusieurs auteurs ont proposé de restreindre la définition de la qualité de vie aux aspects liés à la santé en sollicitant l'opinion des personnes enquêtées sur les principaux domaines qui composent la qualité de vie : autonomie, symptômes physiques, état psychologique, relations sociales et matérielles, loisirs, sexualité, image de soi... auxquels il est possible d'ajouter des questions générales. On parle alors de *mesure de qualité de vie liée à la santé*. Il s'agit de quantifier certains attributs de la santé, de la qualité de vie ou de la satisfaction dans une perspective décisionnelle. Les instruments utilisés sont composés de questions qui

sont regroupées pour l'analyse en dimensions (ou concepts) mesurées au moyen d'un score. L'intérêt de cette approche est de fournir des informations contrôlées et reproductibles. Son inconvénient majeur tient en ce qu'elle est normative car l'existence d'un trouble ou d'un symptôme n'implique pas systématiquement un retentissement péjoratif sur la qualité de vie.

B. Application et intérêt de la mesure de qualité de vie

La mesure de la qualité de vie est le plus souvent utilisée dans les essais cliniques (phases III) comparant l'efficacité de deux ou plus de deux schémas thérapeutiques. Elle intervient généralement sous forme de critère secondaire d'évaluation.
La mesure de la qualité de vie peut également être utilisée dans différentes situations :

- dans la prise en charge des malades : analyse en « temps réel » des domaines nécessitant pour les sujets une action adaptée (application aux soins courants habituels, aux besoins des malades en fin de vie…) ;
- dans l'accompagnement des actions de santé publique : évaluation, par exemple, de l'impact d'une campagne de dépistage sur la qualité de vie des personnes dépistées, que le résultat du test soit positif ou négatif.

Certains auteurs tentent aussi de mettre au point un outil qui puisse pondérer la quantité de vie par la qualité de vie. Cet aspect intéresse surtout les économistes de la santé qui souhaitent, par ce biais, réaliser des évaluations médico-économiques de type coût-efficacité de plusieurs prises en charge thérapeutiques concurrentes.
Le Qaly (*Quality-adjusted life years*, durée de vie ajustée sur la qualité de vie), est un indicateur de portée universelle. Il s'obtient en multipliant la durée de vie exprimée en années par un coefficient compris entre 0 (mort) et 1 (parfaite santé). Ce coefficient (appelé « utilité ») correspond à la valeur que le sujet attache à son état de santé. Le concept est ici un peu différent de la qualité de vie puisqu'il reflète à la fois la qualité de vie, et la valeur de celle-ci par rapport à la mort ou un état de santé optimal. Ce coefficient est estimé en interrogeant directement le sujet : il peut être dérivé d'un score global d'un questionnaire de qualité de vie, d'un choix sur une grille combinant état psychologique et état physique, d'un choix présenté au sujet selon le système du pari (choix entre une durée de vie en parfaite santé plus courte par rapport à une durée de vie avec une santé altérée plus longue) ou de la loterie (choix entre une santé parfaite et un risque x de décès immédiat par rapport à un état de santé altérée). L'utilisation de cet indicateur Qaly est cependant encore du domaine de la recherche compte tenu de ses problèmes conceptuels, la majorité des spécialistes de la qualité de vie n'acceptant pas qu'un score global de qualité de vie puisse servir de mesure d'utilité.

C. Les principales échelles de mesure de la qualité de vie

Si les premiers questionnaires de santé étaient renseignés par le médecin (Spitzer, 1981), les instruments utilisés aujourd'hui doivent l'être par le sujet lui-même. On distingue les instruments de santé génériques des instruments spécifiques.

Les *instruments génériques* sont des autoquestionnaires applicables à une population en bonne santé ou à une population de sujets malades. Ces questionnaires peuvent être associés à des échelles utilisées en psychiatrie mesurant, par exemple, l'anxiété ou la dépression.

Les *instruments spécifiques* s'adressent à une population de sujets atteints d'un symptôme (par exemple, sujets souffrant de douleur chronique) ou d'une pathologie (par exemple, femmes atteintes d'un cancer du sein).

Certains instruments associent un questionnaire générique central explorant les dimensions générales de la qualité de vie et de modules spécifiques de différents organes ou symptômes (questionnaires Fact : *Functional assessment cancer treatment*, Cela 1993 ; EORTC QLQ-C30 : *European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life core questionnaire*, Aaronson 1993).

Les questionnaires de mesure doivent comprendre un nombre de questions suffisant pour explorer les divers aspects de la qualité de vie liée à la santé, sans pour autant être trop longs pour éviter de lasser le sujet. La mise au point de ce type d'autoquestionnaire répond à des critères précis. Les questionnaires doivent posséder des propriétés psychométriques bien établies, en particulier des critères de validité (validité de contenu, validité perçue, validité de structure, validité concourante, validité de prédiction) permettant de juger la pertinence de l'outil de mesure. Ces questionnaires doivent également être sensibles (capables de mesurer les modifications de l'état du sujet), spécifiques (ils ne doivent prendre en compte que le phénomène que l'on veut mesurer) et fiables (fournir des résultats comparables dans des situations identiques). De nombreux instruments de mesure validés existent, la plupart d'entre eux en langue anglaise. Il a donc été nécessaire d'en faire une adaptation culturelle en français, ce qui requiert une méthodologie rigoureuse, de façon à vérifier chez les sujets de culture française que la fiabilité et la validité du questionnaire traduit sont maintenues.

Conclusion. Les études de qualité de vie sont des compléments indispensables à l'évaluation de l'état de santé d'une population. En pratique, ces études sont le plus souvent réalisées auprès de populations de sujets malades. Un protocole rigoureux doit être élaboré avant toute mise en place d'une étude de qualité de vie dont les objectifs doivent être clairement définis, les instruments de mesure pertinents et utilisés à bon escient.

V. Sources d'information

A. Mortalité

Tout décès survenant sur le sol national est obligatoirement déclaré auprès du bureau de l'état civil et enregistré par l'Institut national de la statistique et des études économiques (Insee, www.insee.fr), comme le sont systématiquement les naissances, les mariages, les divorces, les naturalisations et les pertes de nationalité.

La constatation du décès est obligatoirement effectuée par un médecin qui établit un *certificat de décès* nominatif portant mention de la cause de décès (procédure

générale concernant les personnes nées vivantes et non celle utilisée pour les enfants mort-nés). La partie inférieure du certificat mentionnant la cause de décès est, en France, confidentielle et transmise au médecin de Santé publique de la DDASS qui la transmet ensuite à l'Inserm. En effet, si l'exploitation des données de mortalité est faite par l'Insee, la codification des causes de décès et leur exploitation sont confiées à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès : CepiDc – Inserm, www.inserm.fr).
Les informations de l'année n–2 sont disponibles au niveau national, régional et départemental (Direction départementale ou régionale de l'action sanitaire et sociale, Observatoire régional de la santé, échelon régional de l'Insee).

B. Morbidité

La plupart des données d'incidence concernant les maladies aiguës ou chroniques observées en France sont publiées par l'Institut de veille sanitaire (InVS) dans le *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, disponible sur le site de l'InVS (www.invs.sante.fr). C'est en particulier le cas des données issues des registres de morbidité. Les données de population sont publiées par l'Insee et en grande partie disponibles sur son site, ou encore par l'Institut national d'études démographiques (Ined, www.ined.fr).
Le code de la Santé publique fait obligation aux médecins de déclarer des maladies dont la liste est publiée par décret (30 maladies devant faire l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles et dont certaines justifient une intervention urgente et une enquête). Ces déclarations sont transmises à l'InVS qui en assure l'exploitation (www.invs.sante.fr).
Il existe également des réseaux de surveillance qui maillent un territoire donné, impliquant des professionnels chargés de déclarer de façon anonyme à un centre coordonnateur tous les cas d'une maladie donnée. Ces réseaux « sentinelles » ont pour but de repérer le début d'une épidémie et son développement. Le réseau Grog (Groupes régionaux d'observation de la grippe, www.grog.org) en est un exemple.
Au sein des établissements de soins publics et privés, le Programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) recueille les données sociodémographiques, les diagnostics et les actes réalisés concernant tous les patients hospitalisés. Ce recueil est exhaustif et mis à jour tous les trois mois. Il peut servir de base à des enquêtes épidémiologiques.
Les caisses d'assurance maladie enregistrent les affections de longue durée (ALD), les accidents du travail et les maladies professionnelles. L'accession à ces données est souvent difficile et réservée aux professionnels de santé.
L'Institut National de Prévention et d'Information pour la Santé (Inpes, www.inpes.sante.fr) ou l'Institut de recherche et de Documentation en Économie de la Santé (Irdes, www.irdes.fr) réalisent également des enquêtes nationales et publient régulièrement des « baromètres » portant sur les comportements (tabagisme, alcoolisme, infection par le virus du Sida, etc.) de certains groupes de population.

C. Qualité de vie

Aucune donnée de qualité de vie au sens épidémiologique du terme n'est disponible pour la population française. Certaines données parcellaires peuvent être accessibles ici ou là sur des sites spécialisés. La plupart des épidémiologistes spécialistes en ce domaine produisent leurs résultats sous forme de publications scientifiques dans des journaux à comité de lecture, édités en anglais pour la majorité d'entre eux.
Une liste des instruments génériques est disponible sur le site www.qolid.org.

L'essentiel de la question

Même si la mesure de l'état de santé d'une population ne peut se résumer à la seule exploitation d'indicateurs statistiques, une connaissance précise et répétée de leur valeur participe à son évaluation.
Les indicateurs classiquement utilisés concernent les naissances, l'espérance de vie à la naissance et aux différents âges de la vie, la morbidité et la mortalité. Au sein de ces familles d'indicateurs, de multiples paramètres sont définis qui permettent de cerner au plus près l'état de santé de la population cible.
Certains paramètres (taux bruts) sont le reflet de la situation à un instant donné. Ils sont spécifiques de la population mais ne peuvent être comparés avec les indicateurs caractéristiques d'une autre population.
D'autres paramètres (taux standardisés) ont été conçus pour permettre la comparaison entre plusieurs populations à un instant donné, ou entre plusieurs mesures successives dans le temps pour une population donnée. Ainsi, l'évaluation de l'amélioration ou de la détérioration de l'état de santé est-elle possible et riche en informations utiles pour le décideur.
La qualité de vie est un concept récent, né de l'aspiration des populations riches à une vie « meilleure ». Sa définition varie selon la qualité des auteurs : médecins, psychosociologues, économistes de la santé. Son appréhension est complexe puisqu'elle ne peut raisonnablement se faire qu'avec la participation des personnes composant la population étudiée. Les indicateurs développés sont encore aujourd'hui loin de faire l'unanimité des spécialistes. Aussi doit-on considérer les études de qualité de vie comme faisant encore partie du domaine de la recherche.

Pour en savoir plus

- Définitions et informations générales sont disponibles sur le site http://perso.orange.fr/mgd/epipath
- Brucker G., Fassin D. *Santé publique*, Paris, Ellipses, 1989.
- Jenicek M., Cléroux R. *Épidémiologie. Principes, techniques, applications*, Paris, Maloine, 1982.
- Schraub S., Conroy T. *Qualité de vie et cancérologie*, John Libbey Eurotext, Paris, 2002.



Notions de risque

M. HENRY-AMAR, Service de recherche clinique,
centre François Baclesse, Caen.
P. PERNET, Service de Biochimie A, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP,
Paris (révision 2007).

En épidémiologie, le risque correspond à la probabilité de survenue d'une maladie au sein d'une population, au cours d'un intervalle de temps donné. Cette notion a été abusivement étendue à l'individu alors que l'estimation de cette probabilité est toujours faite au niveau d'une population. Le risque est un nombre sans dimension compris entre 0 et 1.
Il est possible de calculer le risque d'être malade à partir des observations réalisées au sein d'une population à condition que tous les sujets qui la composent soient suivis pendant la période d'intérêt.
Soit O le nombre de sujets ayant développé la maladie M au cours de la période d'observation, et N le nombre de sujets composant la population étudiée, présents au début de la période d'observation. Si l'état de santé des N sujets au cours de cette période est connu à la fin de la période d'observation, le risque d'apparition de la maladie M est le rapport O/N exprimé en pourcentage. La valeur de ce rapport est comprise entre 0 et 1.
Dans ces conditions, le risque est égal à l'incidence de la maladie. Si une partie de la population est censurée (par exemple, sujets perdus de vue), le calcul du risque fait alors intervenir la notion de temps pendant lequel les sujets ont été suivis.
Les études épidémiologiques menées ont permis de mettre en évidence des différences entre populations quant à leur risque de développer certaines pathologies. Ainsi a-t-on observé que la luxation congénitale de la hanche, pathologie rare du nouveau-né, était en France absente dans certaines régions alors que son incidence pouvait atteindre 5 à 6 cas pour 1 000 naissances en Bretagne (pays bigouden) ou dans le Massif central. Cette affection est aussi six fois plus fréquente chez la petite fille que chez le garçon. Cette observation a conduit à faire l'hypothèse du caractère héréditaire de l'affection, hypothèse qui a été partiellement confirmée par la suite puisque l'on sait aujourd'hui qu'il existe deux composantes prédisposant à son développement : une composante génétique et une composante mécanique.

I. Facteur de risque

A. Définition

D'une façon générale, le risque de développer une maladie donnée peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de caractéristiques individuelles (âge, sexe, profil « biologique »…), socio-économiques ou environnementales. Ainsi, toute caractéristique (ou facteur) liée statistiquement à l'événement (ici la maladie) étudié est appelée « facteur de risque ». Dans l'exemple précédent, le sexe féminin peut être considéré comme un facteur de risque individuel concernant la luxation congénitale de la hanche.
La définition retenue du facteur de risque est large. Elle s'applique aussi bien aux facteurs dont l'association avec la maladie est positive (facteur favorisant ou péjoratif) que négative (facteur protecteur). Par ailleurs, l'importance du facteur de risque est directement proportionnelle au degré de liaison statistique entre la présence (ou l'absence) de ce facteur et la maladie. On retrouve ici la notion de probabilité évoquée plus haut. Cependant, ce n'est pas parce qu'un facteur est lié statistiquement à une maladie qu'il en est la cause.

B. Notion de causalité

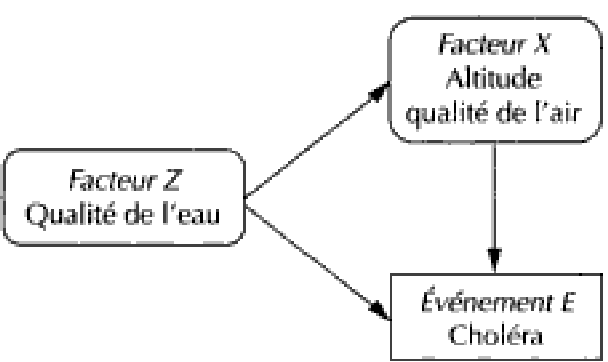
On dit d'un facteur qu'il est la cause d'un événement si une modification de sa fréquence ou de sa valeur moyenne *entraîne* une modification de la fréquence de l'événement étudié. Corollaire : un facteur, pour être causal vis-à-vis d'un événement, ne doit pas obligatoirement être présent, d'une manière nécessaire, ni même suffisante. Ainsi, l'événement peut survenir en l'absence du facteur. Et un sujet qui présente le facteur de risque peut ne jamais développer l'événement.

La nature du lien statistique observé entre un facteur mesuré et une maladie donnée peut être diverse :

- Elle peut être fallacieuse, due à un biais fortuit ou systématique, à une erreur, ou être le fruit du hasard. Supposons que l'on recherche le lien qui pourrait exister entre l'exposition à un produit « dangereux » et la survenue d'une pathologie professionnelle. Si l'enquête est réalisée au sein d'une usine utilisant ce produit, il peut advenir que les sujets professionnellement exposés à ce produit soient moins souvent atteints de la pathologie étudiée que les autres. Cela peut s'expliquer par l'exclusion volontaire des sujets malades, ou par une action préventive excluant les sujets les plus fragiles du groupe exposé. Dans cet exemple, le biais est systématique.
- Il peut s'agir d'une association indirecte. Par exemple, obésité (facteur X) et cardiopathie ischémique (événement E) sont statistiquement liées. Cependant, la présence d'un surpoids augmente le risque d'hypertension artérielle (facteur Y) qui elle-même agit directement sur la survenue d'une cardiopathie ischémique. L'obésité n'est donc pas un facteur de risque causal de cardiopathie ischémique.



- L'association entre un facteur X et l'événement E peut aussi s'expliquer par la présence d'un cofacteur Z, lui-même statistiquement lié aux deux autres. Ainsi, lors d'une épidémie de choléra à Londres au début du XIXe siècle, a-t-on remarqué que les habitants des bords de la Tamise étaient plus fréquemment atteints que ceux habitant sur les collines. Ignorant l'agent causal du choléra (*Vibrio cholerae* découvert par Robert Koch en 1883), les médecins de l'époque ont attribué à la qualité de l'air, plus « pur » au sommet des collines, un effet protecteur vis-à-vis de l'épidémie, négligeant la qualité de l'eau consommée par les Londoniens. Les habitants des bas quartiers consommaient en effet de l'eau stagnante de médiocre qualité par comparaison à celle consommée par les habitants des beaux quartiers, directement puisée dans la nappe phréatique.



Pour affirmer qu'un facteur de risque est un facteur causal de la maladie étudiée, il est nécessaire d'en faire la preuve. Celle-ci ne peut être apportée qu'à l'aide d'une expérience, situation difficile voire impossible à réaliser en épidémiologie. En effet, une telle expérience nécessiterait :

- la constitution par tirage au sort de deux groupes comparables ;
- de faire que les sujets composant l'un des deux groupes soient exposés au facteur étudié et que les sujets de l'autre groupe ne le soient pas ;
- de comparer les taux d'incidence de la maladie observés dans les deux groupes.

En épidémiologie, on se trouve presque toujours en situation d'observation. En l'absence de preuves expérimentales, il faut donc réunir des arguments qui soient en faveur d'une relation causale entre la présence ou l'exposition au facteur X et l'événement E étudié. Ces arguments sont au nombre de sept :

- l'exposition au facteur X doit précéder l'apparition de l'événement E ;
- la relation entre le facteur X et l'événement E doit être constante et reproductible (dans plusieurs populations différentes, étudiées dans différentes conditions) ;
- il doit exister une association statistique forte ;
- on doit observer une relation entre l'intensité de l'exposition au facteur X et le niveau de la réponse (dose-effet) : plus l'exposition au facteur est importante, plus le taux d'incidence de l'événement est élevé (facteur péjoratif) ou au contraire, bas (facteur protecteur) ;
- l'association doit être spécifique : un type d'exposition doit entraîner l'apparition d'un événement particulier et un seul ;
- les résultats des études expérimentales *in vitro* ou chez l'animal doivent être cohérents avec les observations faites chez l'homme : on parle alors de plausibilité biologique ;
- seule une relation causale peut être apportée comme argument pour expliquer l'association observée.

C. Identification des facteurs de risque

Pour identifier les facteurs de risque d'une maladie déterminée, les épidémiologistes ont recours à trois types d'enquêtes en population :

- les *enquêtes transversales* représentent un relevé d'informations à un moment donné dans une population. L'enquête transversale réalise un « cliché » de la situation ; elle peut être mise à profit pour recueillir des informations sur le passé des sujets ;
- les *enquêtes prospectives* consistent à réaliser une étude longitudinale (surveillance) de sujets au cours du temps. À partir de la date d'inclusion dans l'étude, les sujets sont vus à intervalles réguliers, au cours d'examens de surveillance (1 examen au minimum), mais certaines études peuvent se poursuivre plusieurs (dizaines) d'années ;
- les *enquêtes rétrospectives* s'intéressent à ce qui s'est produit dans le passé des sujets de la population étudiée.

La nature de la présence de la maladie M et celle du facteur de risque X étudié peuvent être « aléatoires » ou « contrôlées ». L'adjectif « aléatoire » correspond à la distribution que l'on observerait en examinant la population entière. Lorsque l'expérimentateur fixe lui-même les proportions des classes d'une variable, celle-ci

est dite « contrôlée ». C'est par exemple le cas lorsqu'on compare des groupes constitués dès le départ de sujets malades et de sujets non malades (M est contrôlée), ou si ces groupes sont constitués de sujets fumeurs et non-fumeurs (X est contrôlé).
C'est sur cette notion, X ou M aléatoires ou contrôlés, qu'est fondée la classification des différents types d'enquêtes étiologiques. Il en existe trois types dont les caractéristiques sont décrites ci-après :

- type I : *X et M sont aléatoires*. Un grand nombre de sujets sont nécessaires pour obtenir un nombre « exploitable » de sujets malades. Il peut s'agir d'une étude prospective (sujets non malades au début de l'étude avec mesure du ou des facteurs de risque X, puis enregistrement des sujets développant la maladie M) ou rétrospective (recensement des sujets malades au sein d'un large échantillon, associé à un interrogatoire de tous les sujets sur leur passé) ;
- type II : *X est contrôlé et M est aléatoire*. Il s'agit d'enquêtes prospectives, basées sur la surveillance de deux ou plus de deux groupes de sujets à risque différent de développer la maladie M, dont on compare ensuite l'incidence entre les groupes ;
- type III : *M est contrôlée et X est aléatoire*. Ces enquêtes sont nécessairement rétrospectives. L'enquête consiste à remonter dans le passé d'un groupe de sujets malades (les cas) et d'un groupe de sujets non-malades (les témoins). De nombreux exemples d'études cas-témoins sont disponibles dans la littérature médicale et scientifique car il s'agit des enquêtes dont la réalisation est la plus aisée, la durée la plus courte, nécessitant un nombre de sujets réduit, donc les moins coûteuses ! Ce type d'enquête est en revanche plus discutable : outre la difficulté associée au choix des témoins, de nombreux problèmes de comparabilité existent concernant, en particulier, la qualité des réponses obtenues suivant que le sujet est atteint ou non de la maladie M.

D. Notion de groupe à risque

Il est parfois possible d'identifier des groupes de sujets qui présentent statistiquement plus de facteurs de risque pour une maladie que les autres. Dans cette situation, on parle de groupes à risque. Selon que le ou les facteurs de risque de la maladie sont péjoratifs, ou au contraire protecteurs, on qualifie ces groupes à « haut risque » ou à « faible risque » de développer la maladie M. Si le rôle causal de ce ou ces facteurs pour la maladie est démontré, il est alors licite d'envisager d'agir sur l'exposition à ce ou ces facteurs de risque pour réduire la probabilité d'apparition de la maladie, et de limiter l'action entreprise aux seuls groupes de sujets à haut risque.

E. Mesure du risque

Trois paramètres sont généralement utilisés qui permettent de mesurer le risque associé au facteur étudié.
Soit :

- p_0 la proportion de sujets atteints de la maladie M parmi les sujets non exposés au facteur X ;
- p_1 la proportion de sujets atteints de la maladie M parmi les sujets exposés au facteur X ;

- p_x la proportion de sujets malades que l'on retrouverait chez les sujets exposés au facteur X en l'absence de tout autre facteur que X.

L'hypothèse nulle que l'on teste est que le facteur X n'a aucun rôle sur l'incidence de la maladie M, ce qui peut s'écrire $\mathbf{p_0 = p_1}$.

Pour évaluer l'écart à cette hypothèse, trois indices sont utilisés :

- le *risque relatif* : $RR = p_1/p_0$

  Le rôle propre du facteur X s'évalue alors comme suit : $p_1 = p_x + p_0 - p_x\,p_0$

d'où $$p_x = (p_1 - p_0)/(1 - p_0) \text{ et } 1 - p_x = (1 - p_1)/(1 - p_0)$$

- le *risque attribuable* (RA) au facteur fait intervenir la proportion de sujets exposés dans la population, notée $\mathbf{F_x}$.

$$RA = F_x\,(p_1 - p_0)/[p_0 + F_x\,(p_1 - p_0)]$$

  Cet indice correspond à la proportion de sujets atteints de la maladie M (parmi l'ensemble des malades) que l'on pourrait éviter en réduisant à zéro la fréquence du facteur X dans la population. Il est donc spécifique de cette population ;

- le *odd-ratio* (OR) est calculé par confrontation des quantités L_1 et L_0 calculées à partir d'un groupe N_1 de sujets malades, et d'un groupe N_0 de témoins indemnes de la maladie M :

$$L_1 = f_1/(1 - f_1) \text{ et } L_0 = f_0/(1 - f_0)$$

  où $\mathbf{f_1}$ est la proportion des sujets exposés au facteur X parmi les sujets malades, et $\mathbf{f_0}$ la proportion des sujets exposés au facteur X parmi les sujets indemnes de la maladie M.

  Si l'on remplace f_1 et f_0 par le nombre de cas correspondants $\mathbf{n_1}$ et $\mathbf{n_0}$, on obtient :

$$L_1 = n_1/(N_1 - n_1) \text{ et } L_0 = n_0/(N_0 - n_0)$$

  Le rapport de ces deux quantités est le odd-ratio : $OR = L_1/L_0$

  Son avantage est qu'il constitue une bonne approximation du risque relatif RR dans les enquêtes cas-témoins, à condition que la prévalence de la maladie soit faible à la fois chez les exposés, et chez les non-exposés au facteur X.

  En effet, le risque relatif, qui est le rapport des prévalences ou des incidences en fonction de l'exposition au facteur X, n'est pas directement calculable dans ce cas.

Exemple

Considérons une population d'hommes âgés de plus de 40 ans dont la proportion de fumeurs est égale à 60 %. Soit p_1 = 5 % le risque de décès par pathologie vasculaire chez les fumeurs et p_0 = 2 % la valeur de ce risque chez les non-fumeurs.

Le risque relatif de décès par pathologie vasculaire pour les fumeurs par rapport aux non-fumeurs est

$$RR = 0{,}05/0{,}02 = 2{,}5.$$

L'effet propre du tabagisme est $p_x = (0{,}05 - 0{,}02)/(1 - 0{,}02) = 0{,}031$.

Le risque attribuable au tabagisme est alors égal à

$$RA = 0{,}60 \cdot (0{,}05 - 0{,}02)/[0{,}02 + 0{,}60 \cdot (0{,}05 - 0{,}02)] = 0{,}47.$$

Ainsi, un fumeur a-t-il une probabilité 2,5 fois plus élevée de mourir d'une affection vasculaire qu'un non-fumeur. 3,1 % des fumeurs meurent de pathologie vasculaire uniquement à cause du tabac. Et 47 % de la totalité des décès liés à une pathologie vasculaire pourraient être évités en supprimant le tabac.

Maintenant, si l'on compare au sein d'un échantillon d'hommes âgés de plus de 40 ans le nombre de fumeurs qui sont morts de pathologie vasculaire et le nombre de fumeurs survivants à partir du *tableau* suivant :

	Décès par pathologie vasculaire	Vivants
Fumeurs	150	105
Non-fumeurs	50	95
Total	200	200

on obtient un odd-ratio dont la valeur est très proche de celle du risque relatif calculé précédemment :

$$OR = (150/50)/(105/95) = 2,71.$$

II. Prévention

A. Définitions

Un des aspects de l'épidémiologie s'est développé rapidement au cours des trente dernières années, au fur et à mesure que la multiplication des interventions et l'augmentation des dépenses de santé conduisaient à faire des choix entre différents types d'interventions possibles. Les interventions de prévention sont destinées à éviter la survenue des maladies ou leurs complications éventuelles.
Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), on distingue généralement trois catégories d'actions de prévention :

- *prévention primaire* : tous actes destinés à diminuer l'incidence d'une maladie dans une population en réduisant le risque d'apparition de nouveaux cas. Cette définition correspond à la définition traditionnelle de la prévention ;
- *prévention secondaire* : tous actes destinés à diminuer la prévalence d'une maladie dans une population en en réduisant l'évolution et la durée. Cette définition prend en considération certains aspects du traitement ;
- *prévention tertiaire* : tous actes destinés à diminuer la prévalence des incapacités chroniques dans une population en réduisant au minimum les invalidités fonctionnelles consécutives à la maladie, ou les effets secondaires liés à son traitement. Cette définition étend le concept de la prévention au domaine de la réadaptation.

B. Difficultés des actions de prévention

Les actions de *prévention primaire* s'adressent à des sujets sains, ce qui peut, dans certains cas, constituer un obstacle sur le plan éthique.
Prenons l'exemple des femmes à haut risque de cancer du sein ou de l'ovaire. Ce sont les femmes qui ont dans leur famille, une mère, une sœur ou une tante ayant

développé un cancer du sein ou de l'ovaire avant l'âge de 40 ans, dans deux générations successives, ou qui sont porteuses d'une mutation d'un des gènes de la famille BRCA (pour *breast cancer*). Ces femmes ont une probabilité égale à 50 % de développer un cancer du sein ou de l'ovaire avant l'âge de 50 ans. Pour empêcher la survenue d'un cancer, certains médecins ont suggéré qu'une double mastectomie associée à une ovariectomie bilatérale leur soit proposée dès l'âge de 20 ou 25 ans. Cette attitude étant justifiée par le fait que certaines femmes, conscientes de leur risque, seraient demandeuses d'une intervention préventive radicale.

Les actions de *prévention secondaire* s'adressent à des sujets malades mais avant que ne soit porté le diagnostic de leur maladie, ce qui peut également constituer un obstacle sur le plan éthique.

Prenons l'exemple du dépistage du cancer du colon. Les recommandations concernant ce dépistage pour les départements français « pilotes » où il est organisé indiquent que la population cible est définie par les hommes et les femmes âgés de 50 à 74 ans. Le test de dépistage utilisé est le test Hemoccult dont les propriétés sont connues. Ce test n'est pas sensible à 100 % ; son utilisation entraîne une proportion non nulle de résultats faussement positifs qui aboutiront à la prescription d'examens complémentaires (endoscopie digestive) dont la morbidité (et la mortalité associée) n'est pas nulle. D'autre part, si le fait de diagnostiquer plus tôt une lésion cancéreuse n'a aucun impact sur l'évolution de la pathologie, le malade aura été averti de son état plus tôt (notion d'avance au diagnostic) pour rien ; il aura donc été malade plus longtemps sans bénéfice. Au contraire, les effets négatifs d'un diagnostic sur l'état psychique du malade et sur sa qualité de vie (ou de survie) peuvent être importants, et tout doit être entrepris pour les minimiser.

À l'inverse, les actions de *prévention tertiaire* s'adressant à des sujets malades, les bénéfices attendus peuvent être importants à la fois pour le malade, mais également pour la société, et ce d'autant plus que la pathologie est fréquente ou invalidante, ou que les effets délétères des traitements sont importants.

Pour qu'elles soient appliquées, il est nécessaire que l'efficacité des méthodes d'intervention ait été démontrée expérimentalement, de même que leur faisabilité. Or, ces méthodes sont souvent très complexes. Il peut s'agir de véritables programmes dont la réalisation est difficile à contrôler, d'autant plus que le nombre de sujets « en expérience » est élevé (programmes d'éducation sanitaire, de vaccination à l'échelle d'une population, de prévention par l'administration d'un produit actif comparé à un placebo dans le cadre d'une étude randomisée en population). Parfois, des phénomènes de « contamination » entre les groupes sur lesquels porte l'expérience peuvent survenir, qui interfèrent dans l'analyse des résultats obtenus. Ainsi, dans une expérience portant sur la prévention au cours de la grossesse (comparaison de deux attitudes dans la surveillance des femmes enceintes sans aucun facteur de risque), par un phénomène de contamination des médecins mais également des femmes, le protocole a été mal respecté et le mode de surveillance des deux groupes s'est fortement rapproché. Une autre difficulté réside dans la multiplicité des critères de jugement lorsque l'efficacité d'une intervention est testée dans un contexte réel puisque alors, l'évaluation tiendra compte, en plus de l'efficacité par rapport aux objectifs fixés, du coût de la méthode, des effets indésirables observés, de la tolérance, de la compliance des sujets en expérience…

C. Prévention primaire

Les actions de prévention primaire ont pour but d'empêcher le plus possible l'apparition d'une maladie dans la population. C'est ici, entre autres, le domaine de la vaccination au sens premier du terme. Depuis 1967, l'OMS a mis en place un programme mondial d'éradication de la variole (premier vaccin inventé dont l'efficacité a été prouvée dès 1796 par Edward Jenner). Cette éradication a été proclamée en 1980, le dernier malade déclaré étant un Somalien guéri en 1977. En France, la vaccination de la population a été supprimée au début des années 1990, d'autant que les risques liés à la vaccination (méningo-encéphalite d'évolution souvent mortelle) étaient devenus sans commune mesure en regard du risque de contamination quasi nul. On peut citer d'autres vaccins dont l'efficacité est loin d'être totale mais dont les bénéfices pour les sujets vaccinés (par exemple, la rougeole, première cause de mortalité infantile dans les pays d'Afrique noire) ou pour la société (par exemple, la grippe) sont importants.

D. Prévention secondaire

Les actions de prévention secondaire ne sont pas entreprises pour empêcher la maladie de se déclarer mais pour limiter sa prévalence. Ainsi, un diagnostic précoce devrait-il permettre soit de diminuer la durée de la maladie, soit d'augmenter la probabilité de guérison, la maladie étant diagnostiquée à un stade précoce. Cette situation peut être illustrée par les actions de dépistage du cancer, en particulier celui du cancer du sein, le plus ancien et celui dont le niveau d'efficacité et les difficultés sont les mieux connus.

La fréquence du cancer du sein varie notablement selon les régions et les habitudes de vie. Elle est, par exemple, quatre fois plus importante en Europe du Nord qu'en Europe méditerranéenne.

Les principaux facteurs de risque connus sont l'âge à la première grossesse (plus celle-ci est tardive, plus le risque est élevé ; il est, par exemple, deux fois plus important chez les femmes dont le premier enfant naît après 30 ans qu'il ne l'est chez celles qui mettent au monde avant 20 ans) ; l'obésité ; l'âge aux premières règles (le risque est d'autant plus élevé que la puberté est précoce) ; l'âge à la ménopause (le risque est d'autant plus élevé que celle-ci est tardive ou a été retardée artificiellement) ; une nourriture riche en graisses d'origine animale (viande, produits laitiers non écrémés).

Ces caractéristiques peuvent être utilisées pour définir les femmes à risque de développer un cancer du sein, et par conséquent pour leur proposer une surveillance rapprochée. Il s'agit ici d'une action de dépistage à l'échelon individuel, la femme décidant ou non de se soumettre à une telle surveillance en fonction de sa perception du risque encouru.

Le *dépistage organisé* s'adresse à une population apparemment indemne de l'affection que l'on entend dépister. Il doit permettre de faire le partage entre les personnes apparemment en bonne santé, mais qui sont probablement atteintes de la pathologie recherchée, et celles qui en sont probablement exemptes. Le dépistage n'a pas pour but de poser un diagnostic. Les personnes pour lesquelles les résultats

sont dits positifs ou douteux doivent subir des examens complémentaires nécessaires pour confirmer ou infirmer le diagnostic. Ce n'est qu'après cette étape qu'un traitement peut être entrepris.
Pour qu'une action de dépistage soit efficace, il est nécessaire, compte tenu des difficultés de réalisation et des coûts induits, de réunir plusieurs conditions.

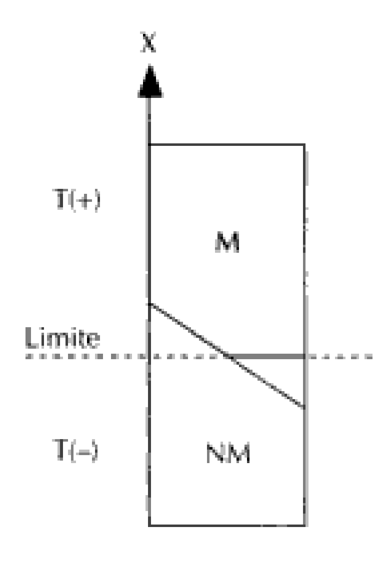
- L'affection que l'on veut dépister doit être fréquente, responsable d'une mortalité ou d'une morbidité substantielles. Il faut que la pathologie constitue une menace grave pour la santé publique. De nombreux cancers, par exemple, soit par leur fréquence élevée, soit par leur gravité ou leur évolution spontanément défavorable, répondent à ce critère. C'est la raison pour laquelle la priorité sera donnée aux lésions que l'on peut mettre en évidence à un stade préclinique, même si elles sont moins fréquentes ; aux cancers pour lesquels une augmentation importante de l'espérance de vie est possible ; à ceux qui touchent essentiellement des personnes jeunes en espérant un gain important sur le nombre d'années de vie perdues ; enfin, à tous ceux pour lesquels on peut attendre une réduction de la mortalité.
  L'efficacité d'un programme de dépistage doit donc être appréciée par l'importance de la diminution de la mortalité, voire de l'incidence, ou par la diminution du nombre d'années potentielles de vie perdues.

- L'histoire naturelle de la maladie doit être bien connue, notamment son évolution, de la phase de latence à la phase symptomatique. Le dépistage, pris au sens large du terme, suppose que toute pathologie présente au cours de son développement une phase préclinique, puis une phase localisée, suffisamment longues pour qu'un diagnostic soit possible au cours de ces deux périodes. Dans le cas du cancer, le dépistage n'a d'intérêt que s'il survient avant la dissémination de la tumeur. Il est important de connaître jusqu'à quel stade de la maladie sa progression vers la mort peut être évitée.
  La connaissance de l'histoire naturelle de la maladie est également utile pour déterminer à quel moment le test peut être appliqué avec le maximum de bénéfice et d'efficacité, et au moindre coût ; elle est indispensable pour estimer les délais entre deux tests et pour définir les âges auxquels le dépistage sera le plus efficace. L'efficacité d'un dépistage dépend aussi de la durée de la phase préclinique de la maladie : plus celle-ci est longue, plus la probabilité que le dépistage soit efficace est importante.
  La *figure* suivante schématise l'évolution d'un cancer, de la première cellule anormale à la tumeur cliniquement palpable (10^9 cellules, soit une tumeur de 1 centimètre de diamètre pesant environ 1 gramme), et au décès du malade. Si un test de dépistage est disponible, il doit être mis en œuvre avant la phase clinique, avant l'apparition du premier symptôme.

- Pour qu'une action de dépistage puisse être envisagée, il faut impérativement disposer d'un test permettant d'identifier les personnes apparemment en bonne santé mais qui sont probablement atteintes de la pathologie. Ce test doit présenter les caractéristiques suivantes : être économiquement viable, efficace, simple d'application, acceptable pour la population, dénué d'effets délétères, reproductible, et fiable.

Nombre de cellules tumorales
10^{12}
10^{9}
Seuil de diagnostic
Temps
Lésion pré-cancéreuse
Phase pré-clinique
Phase clinique
Premier symptôme
Décès par évolution spontanée

La *figure* ci-après illustre les propriétés d'un test dans le cas où celui utilisé est fondé sur la valeur d'une variable quantitative (dosage sanguin par exemple). La valeur-seuil (limite) du dosage à partir de laquelle le résultat du test est considéré comme positif [T(+)] peut varier, par exemple en fonction de la méthode de dosage, ou être définie par l'investigateur. La proportion de sujets dépistés comme potentiellement malades [M] varie alors en fonction de la valeur-seuil.
Outre sa reproductibilité, sa fiabilité et son coût, un test diagnostique est caractérisé par deux paramètres : sa sensibilité (Se) et sa spécificité (Sp).



La sensibilité d'un test est définie comme la probabilité que le test soit positif parmi les personnes atteintes de la maladie ; c'est l'aptitude à détecter la maladie M lorsqu'elle existe réellement.

$$Se = prob\ [T(+)/M]$$

La spécificité d'un test est définie comme la probabilité que le test soit négatif parmi les personnes indemnes de la maladie ; c'est l'aptitude à éliminer la maladie M quand elle n'existe effectivement pas.

$$Sp = prob\ [T(-)/NM]$$

Sur la *figure*, la limite inconnue qui sépare en réalité les sujets malades des sujets indemnes est matérialisée par la ligne continue ; elle se distingue de la limite horizontale en pointillé utilisée en pratique. Il existe donc, de part et d'autre de cette limite, des sujets malades pour lesquels le résultat du test est négatif (faux négatifs) et des sujets indemnes pour lesquels le résultat du test est positif (faux positifs). C'est ce qu'expriment la sensibilité et la spécificité du test. On souhaite, bien entendu, que ces deux indices soient, autant que possible, proches de 100 %. Malheureusement, comme l'indique la *figure*, si la sensibilité augmente, la spécificité diminue, et inversement. Autrement dit, le test parfait n'existe pas.
Plus généralement, les résultats d'une action de dépistage peuvent être exprimés de la façon suivante :

	Sujets malades (M)	**Sujets indemnes (NM)**
Test positif (T+)	Vrais positifs (VP)	Faux positifs (FP)
Test négatif (T)	Faux négatifs (FN)	Vrais négatifs (VN)

La sensibilité observée du test, qui se calcule à partir des résultats chez les sujets malades, est :

$$Se = VP/(VP + FN)$$

La spécificité observée du test, qui se calcule à partir des résultats chez les sujets indemnes, est :

$$Sp = VN/(VN + FP)$$

Ces deux indices permettent de vérifier que les « propriétés » du test utilisé sont bien conformes à ce qui était attendu. Mais, dans le cas d'une population soumise à un programme de dépistage, les sujets malades et indemnes de la maladie M ne sont pas connus. Seul est connu le résultat du test de dépistage dont on espère qu'il est un bon « indicateur » pour identifier les sujets porteurs asymptomatiques de la maladie M.
Deux nouveaux indices peuvent ainsi être évalués qui, à l'inverse des deux précédents, sont calculés parmi les sujets dont le test est positif ou négatif. On parle alors de valeur prédictive (VP) du test, valeur prédictive positive (VPP) si l'indice est calculé parmi les sujets dont le test est positif, valeur prédictive négative (VPN) si l'indice est calculé parmi ceux dont le test est négatif. La VPP correspond à la probabilité d'être malade quand le test est positif et la VPN est la probabilité de ne pas l'être lorsque le test est négatif. D'où :

$$VPP = VP/(VP + FP) \quad \text{et} \quad VPN = VN/(VN + FN)$$

Un cinquième indice, le rapport K = VPP/(1 – VPN), est aussi informatif. Il signifie que, pour les sujets soumis au dépistage, la probabilité qu'ils soient atteints de la maladie M est k fois plus importante lorsque le test est positif que lorsqu'il est négatif. Ce rapport est identique au risque relatif tel qu'il est défini en épidémiologie (*cf. supra*).
Du point de vue de la santé publique, un dépistage de masse n'aura d'intérêt que si les proportions de sujets FP et de sujets FN sont peu importantes (examens complémentaires diagnostiques et effets délétères physiques et psychologiques limités pour les sujets FP ; erreur de diagnostic dont les conséquences peuvent se révéler néfastes pour les sujets FN).
Pour maximiser les valeurs prédictives du test, il est nécessaire de bien définir la population soumise au dépistage. Il est possible, en effet, de montrer que les VPP et les VPN dépendent de la prévalence de la maladie dans la population cible. Soit les deux populations A et B qui ont été soumises au même test de dépistage de la maladie M, test dont la sensibilité et la spécificité sont respectivement égales à 75 % et à 96 %.

Test	Maladie		Total
	Absente	Présente	
Négatif	95 842	41	95 883
Positif	3 993	124	4 117
Total	99 835	165	100 000

Population A
Se = 75 % Sp = 96 %
Prévalence de la maladie = 0,165 %
VPP = 3 % VPN > 99,9 %
k = 70

Test	Maladie		Total
	Absente	Présente	
Négatif	94 416	410	94 826
Positif	3 934	1 240	5 174
Total	98 350	1 650	100 000

Population B
Se = 75 % Sp = 96 %
Prévalence de la maladie = 1,65 %
VPP = 24 % VPN = 99,6 %
k = 55

Cet exemple illustre bien le fait que lorsque la prévalence de la maladie augmente (multipliée dans cet exemple par 10), la VPP augmente dans la même proportion sans que la VPN et le facteur k soient significativement affectés.
Ainsi, un programme de dépistage d'une maladie M en population sera d'autant plus efficace que la maladie sera fréquente (prévalence élevée). C'est cette notion qui prévaut pour limiter le dépistage de masse, gratuit, du cancer du sein, pour reprendre notre exemple, aux femmes âgées de 50 à 74 ans. C'est dans cette tranche d'âge que l'incidence est la plus élevée d'une part, et que le test proposé (la mammographie) est le plus performant (bonne sensibilité), d'autre part.
Les autres facteurs de risque connus ne peuvent être pris en compte dans la définition de la population cible d'un programme de dépistage de masse, et ce pour deux raisons principales :

- les caractéristiques (facteurs de risque) individuelles ne sont connues que des sujets ; elles sont inconnues des pouvoirs publics ;
- plus la définition des groupes à risque est précise, plus la probabilité est importante de « manquer » la population cible et donc de fortement diminuer l'efficacité du dépistage.

Il est donc nécessaire de trouver un juste équilibre entre une population très ciblée (associée à une prévalence de la maladie élevée) et une participation (compliance)

acceptable au programme proposé. C'est d'ailleurs sur ce point que viennent buter tous les programmes de dépistage de masse. Il a, en effet, été calculé que pour qu'un programme entrepris soit efficace (baisse significative de la mortalité), il faut qu'au minimum 60 % des personnes composant la population cible y participent. En France, contrairement à d'autres pays, nordiques en particulier, le taux de participation est en général voisin de 40 % malgré des campagnes d'information.
Précisons, cependant, qu'il en va différemment lorsque par exemple, le dépistage est obligatoire. C'est le cas notamment pour le dépistage de la phénylcétonurie (oligophrénie phénylpyruvique), maladie très rare (1 cas sur 15 000 naissances) mais extrêmement grave pour l'avenir psychomoteur des enfants qui sont atteints d'un déficit en phénylalanine hydroxylase, anomalie génétique empêchant la métabolisation de la phénylalanine au niveau du foie. Le test de Guthrie (sensibilité 100 %) permet d'identifier les enfants atteints à la naissance. Le traitement consiste à supprimer totalement la phénylalanine de l'alimentation de ces enfants jusqu'à l'âge de 4 ans.

E. Prévention tertiaire

S'adressant à des populations de personnes malades, la prévention tertiaire consiste à limiter les handicaps liés à la maladie ou à son traitement, ou les effets délétères de ce dernier.
L'exemple des progrès thérapeutiques obtenus dans la prise en charge du lymphome de Hodgkin chez l'enfant est caricatural. Maladie hématologique maligne envahissant principalement les ganglions lymphatiques, son incidence est faible (0,6 cas pour 100 000 enfants de moins de 15 ans). Dans les années soixante, les traitements en vigueur (monochimiothérapie et radiothérapie) ne permettaient de guérir que 60 % des malades. L'utilisation de la radiothérapie grands champs et hautes énergies et des polychimiothérapies de première génération ont, dès les années soixante-dix, permis d'améliorer considérablement les taux de guérison mais au prix de complications majeures (infections gravissimes, stérilité, complications cardiaques et pulmonaires, seconds cancers) liées à la fois à la radiothérapie, et à la chimiothérapie. Aujourd'hui, la réduction des doses de radiothérapie et des volumes irradiés, ainsi que l'administration de polychimiothérapies beaucoup moins toxiques, aboutissent à la guérison dans près de 100 % des cas et ce, sans séquelles. Des exemples comparables sont nombreux à tous les âges de la vie, intéressant (presque) toutes les pathologies.

L'essentiel de la question

Chacun d'entre nous présente une probabilité (risque) plus ou moins importante de développer telle ou telle maladie. Cette probabilité est fonction de facteurs intrinsèques (âge, sexe, génotype...) mais également de facteurs extrinsèques (caractéristiques sociales, environnement). Certains de ces facteurs peuvent favoriser ou, au contraire, limiter la survenue de la maladie. On parle alors de facteur de risque (péjoratif ou protecteur) dont il est toujours nécessaire de déterminer s'il est agent causal ou non de la maladie.

Un agent est considéré comme cause d'un événement (maladie) si une modification de sa fréquence ou de sa valeur moyenne entraîne une modification de la fréquence de cet événement. Il s'ensuit que la soustraction de la population ou d'une fraction de celle-ci à l'exposition à l'agent causal de la maladie entraînera une diminution importante de son incidence. C'est la prévention primaire. Celle-ci inclut la vaccination dont l'objectif est de rendre inoffensif pour l'individu l'exposition à un agent pathogène (bactérie, virus).
Lorsqu'une action sur l'agent causal d'une maladie est impossible (cause inconnue, maladie dégénérative...), il peut être intéressant, du point de vue de la santé publique, d'en faire le diagnostic le plus tôt possible afin de permettre son traitement à moindre coût (traitement moins agressif, efficacité plus importante, séquelles limitées). On parle alors de prévention secondaire puisque la population qui en bénéficiera est déjà malade, que les sujets atteints présentent ou non des signes cliniques ou biologiques liés à la maladie. Le dépistage représente un volet important, en terme de santé publique, des actions de prévention secondaire.
Les gains obtenus en termes de prise en charge des maladies, liés entre autres aux progrès techniques dans le domaine de la santé, participent de la prévention tertiaire dont l'objectif est de diminuer les invalidités fonctionnelles consécutives à la maladie ou à son traitement.

Pour en savoir plus

- Définitions et informations générales sont disponibles sur le site http://perso.orange.fr/mgd/epipath
- Ahlbom A., Norell S. *Introduction to modern epidemiology*., Epidemiology Resources Inc., Chestnut Hill, 1984.
- Bouyer J., Hémon D., Cordier S., Derriennic F., Stücker I., Stengel B., Clavel J. *Épidémiologie. Principes et méthodes quantitatives*. Éd. Inserm, Paris, 1993.
- Brucker G., Fassin D. *Santé publique*. Ellipses, Paris, 1989.
- Demaille A., Cappelaere P. *Prévention et diagnostic des cancers*. Collection Encyclopédie des cancers, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1989.
- Jenicek M., Cléroux R. *Épidémiologie. Principes, techniques, applications*. Maloine, Paris, 1982.
- Rumeau-Rouquette C., Bréart G., Padieu R. *Méthodes en épidémiologie*. Collection Statistique en biologie et en médecine. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1981.
- Sackett D.-L., Brian Haynes R., Tugwell P. *Clinical epidemiology. A basic science for clinical medicine*. Little, Brown and Company, Boston, 1985.

Droits des patients

F. TABOULET, Droit pharmaceutique et économie de la santé,
Inserm U558, université Paul-Sabatier, Toulouse-3
M. AULOIS-GRIOT, Service de droit et économie de la santé,
Inserm U657, université Victor-Segalen, Bordeaux-2

Les termes « droits des patients », ou plus précisément, en termes équivalents, « droits des personnes malades et des usagers du système de santé », constituent depuis 2002 l'un des titres de la première partie législative du Code de la santé publique (CSP). C'est donc à partir du plan de ce code que nous délimiterons le champ de notre sujet.

Il convient tout d'abord de rappeler le plan des premières pages du Code de la santé publique :

Première partie. Protection générale de la santé
Livre 1er. Protection des personnes en matière de santé
(art. L. 1110-1 à 1151-1)
Titre Ier. Droits des personnes malades et des usagers du système de santé
Chapitre préliminaire. Droits de la personne
Chapitre Ier. Information des usagers du système de santé et expression de leur volonté
Chapitre II. Personnes accueillies dans les établissements de santé[1]
Chapitre IV. Participation des usagers au fonctionnement du système de santé
Titre II. Recherches biomédicales
Titre IV. Réparation des conséquences des risques sanitaires

Nous écarterons de notre étude les titres II et IV :

- *les recherches biomédicales font l'objet d'un cadre juridique spécifique qui ne peut être envisagé que de façon globale ;*
- *le droit à indemnisation en cas de préjudice fait appel aux principes de la responsabilité médicale, domaine qui dépasse largement le thème proposé.*

De même, les droits collectifs des usagers à participer au fonctionnement du système de santé (chapitre IV du titre Ier), élément de la démocratie sanitaire visant à créer un nouveau mode de gouvernance participative avec les patients-citoyens au sein des établissements de santé, des institutions de conciliation et d'indemnisation, et des instances où sont identifiées les priorités de santé et décidées les politiques, seront aussi considérés ici comme en dehors des limites de notre sujet.

I. Origines de la notion de droits des patients[2]

Avant d'énoncer et d'analyser ces droits des patients, nous chercherons leur origine dans l'éthique médicale, la philosophie des droits de l'homme, et le droit positif français.

A. Droits des patients et éthique médicale

La notion de droits des patients est aussi ancienne que l'exercice de la médecine, puisque c'est précisément la reconnaissance du malade comme personne et sujet de droit qui fonde les devoirs déontologiques traditionnels que s'est forgés le corps

1. Le chapitre III ne concerne pas directement les droits des patients puisqu'il est consacré à la responsabilité des établissements à l'égard des biens des personnes accueillies.
2. Cf. Andorno R., *La Bioéthique et la dignité de la personne*, PUF, 1997.

médical depuis Hippocrate (Ve siècle avant Jésus-Christ). Constituant en effet le corollaire des obligations des professionnels de santé vis-à-vis des malades, les droits de ces derniers ont été pendant des siècles envisagés et formulés « à l'envers », dans la morale professionnelle progressivement consacrée par l'usage et énoncée dans les codes de déontologie.

Si ces règles traditionnelles se fondent sur les trois principes cardinaux du courant contemporain anglo-saxon de bioéthique, les principes de bienfaisance (qui intègre le principe de non-malfaisance, parfois identifié comme le premier des quatre principes), d'autonomie et de justice, la consécration juridique des droits des patients met l'accent sur le principe d'autonomie.

B. Droits des patients et philosophie des droits de l'homme

La notion de droits des patients renvoie bien sûr au thème plus vaste des droits de l'homme. Dans la civilisation occidentale, depuis l'Antiquité, pratiquer la justice signifie donner à chacun ce qui lui est dû, reconnaître à chacun « son droit », celui-ci ayant été assimilé par certains auteurs à « sa dignité ». C'est cette intuition, largement étayée par de nombreux philosophes, selon laquelle la dignité est une qualité propre à la personne humaine, et donc identique pour tous, qui a été développée au cours des deux derniers siècles par la philosophie des droits de l'homme. Dans la Déclaration universelle des droits de l'homme de 1948, les Nations unies ont proclamé qu'il y a une « dignité inhérente à tous les membres de la famille humaine », et que « tous les êtres humains naissent libres et égaux en dignité et en droits ».

C. Droits des patients et droit positif français

« Des droits inaliénables et sacrés » sont également reconnus à « tout être humain, sans distinction de race, de religion ni de croyance », par la Constitution française (préambule de la Constitution de 1946). Ces droits de l'homme, de tout homme, y compris de l'homme malade, sont déclinés dans le système de santé en tant que droits du patient. Il s'agit ici de droits subjectifs, au sens de pouvoirs juridiques reconnus, qualifiés de « droits créances » dans la mesure où ils obligent un tiers : les professionnels de santé doivent les respecter et tenter de les rendre effectifs, et la puissance publique doit chercher à les garantir. Ces droits subjectifs sont énoncés, consacrés, sauvegardés par le droit objectif, défini comme l'ensemble des normes juridiques [3]. Le droit de la santé en tant que corps de règles applicables aux activités dont l'objet est de restaurer la santé, de la protéger, et d'en prévenir la dégradation, vise en particulier à protéger les droits de chaque patient, et notamment les plus fragiles, les plus faibles, les plus dépendants [4].

---

3. Rappelons que la règle de droit est instituée en vue du bien commun ; le droit constitue en effet l'un des modes de régulation sociale, appelé à fixer le *minimum ethicum*. Cela signifie que les principes éthiques liés aux missions des professionnels de santé sont, d'une part, antérieurs à leur consécration juridique et, d'autre part, plus ambitieux, plus exigeants et plus élevés, dans le sens où l'éthique est la science du bien, et qu'il n'existe pas de limite supérieure à la qualification morale, à la bonté d'un acte.
4. Le droit (subjectif) est à l'abri de la loi (droit objectif), dit-on communément.

Les principes juridiques fondamentaux du droit de la santé, et notamment ceux qui concernent les droits des patients, sont anciens et affirmés dans diverses sources écrites du droit français – Constitution, articles législatifs codifiés dans le Code civil [5], dans le Code pénal et dans le Code de la santé publique (CSP), codes de déontologie des professionnels de santé, textes infraréglementaires, comme par exemple la Charte du patient hospitalisé [6], etc. – ainsi que dans la jurisprudence.
Ils ont été affirmés, précisés, nuancés, enrichis ou étendus par la loi du 4 mars 2002 « relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé » [7], dite loi Kouchner, par des articles réunis sous le titre « démocratie sanitaire ». Modifiant les premiers chapitres de la partie législative du Code de la santé publique, ils consacrent et unifient les droits des patients, les termes de « malades », « patients », « clients » et « usagers » qui font référence à différents secteurs du système de santé (médecine libérale, établissements et services de santé publics et privés, réseaux de santé) ou à différents statuts juridiques, étant ici assimilés.
Nous analyserons donc ci-dessous les droits des patients tels qu'ils figurent dans les premiers articles législatifs du Code de la santé publique. Mais rappelons tout d'abord que, dotés d'une valeur constitutionnelle, trois principes fondamentaux constituent le socle de tout l'édifice :

- le principe de sauvegarde de la dignité de la personne contre toute forme d'asservissement et de dégradation,
- le droit à la protection de la santé,
- la liberté individuelle.

---

5. Le Code civil consacre certains principes du droit de la santé. Quelques-uns de ceux-ci, comme le respect du corps humain, l'inviolabilité et l'indisponibilité du corps humain ne seront pas explicitement repris dans le CSP dans la partie que nous avons choisie de développer (titre Ier du livre Ier) et sont cités ci-dessous :
   – article 16 : « La loi assure la primauté de la personne, interdit toute atteinte à la dignité de celle-ci et garantit le respect de l'être humain dès le commencement de sa vie. »
   – article 16-1 : « Chacun a droit au respect de son corps. Le corps humain est inviolable. Le corps humain, ses éléments et ses produits ne peuvent faire l'objet d'un droit patrimonial. »
   – article 16-3 : « Il ne peut être porté atteinte à l'intégrité du corps humain qu'en cas de nécessité médicale pour la personne ou à titre exceptionnel dans l'intérêt thérapeutique d'autrui. Le consentement de l'intéressé doit être recueilli préalablement hors le cas où son état rend nécessaire une intervention thérapeutique à laquelle il n'est pas à même de consentir. »
6. Publiée dans une annexe à la circulaire ministérielle du 6 mai 1995, c'est le premier texte qui a explicité les droits des malades. Une nouvelle version a été publiée le 2 mars 2006 (circulaire DHOS/E1/DGS/SD1B/SD1C/SD4A/2006/90 relative aux droits des personnes hospitalisées et comportant une Charte de la personne hospitalisée).
7. *Journal officiel* du 5 mars 2002.

II. Droits de la personne tels qu'énoncés par le Code de la santé publique

A. Droits relatifs à la santé

1. Droit à la protection de la santé [8]

Le droit à la protection de la santé (et non le « droit à la santé » comme on l'a écrit quelquefois de façon erronée, puisqu'il ne s'agit pas d'un droit à un bon état de santé, mais seulement d'un droit d'accès à des actions de prévention et aux soins) est premier car il est intrinsèquement lié au droit à la vie, premier droit et premier bien, sans lequel tous les autres droits, biens et libertés seraient vains. La vie étant la condition *sine qua non* du déploiement des potentialités du sujet, le droit à la vie, avec son corollaire, le droit à la protection de la santé, est la racine et la source de tous les autres droits. Le principe du respect de la vie peut être considéré comme le principe éminent de la bioéthique, qui guide et inspire l'application des autres principes [9].

Le droit à la protection de la santé est un droit créance qui a son pendant d'une part dans l'obligation de moyen des professionnels appelés à prendre en charge le patient, et d'autre part dans la responsabilité de la puissance publique à assurer à tous l'accessibilité géographique et financière des actions de prévention et de soins de qualité [10]. La protection de la santé comprend en particulier :

- la continuité de la prise en charge du patient, grâce, le cas échéant, à la coordination de différents professionnels de santé ;
- la meilleure sécurité sanitaire possible, c'est-à-dire la sécurité des personnes contre des risques thérapeutiques de toute nature qu'il convient d'identifier et de prévenir ou minimiser au mieux, sachant, bien évidemment, que le « risque zéro » n'existe pas.

2. Droit aux soins les plus appropriés

L'affirmation de ce droit général à la protection de la santé est complétée par un autre article qui précise les règles de toute décision médicale, prise au cas par cas. L'article L. 1110-5 du CSP dit notamment que « toute personne a, compte tenu de son état de santé et de l'urgence des interventions que celui-ci requiert, le droit de recevoir les soins les plus appropriés et de bénéficier des thérapeutiques dont l'effi-

8. Article L. 1110-1 du CSP : « Le droit fondamental à la protection de la santé doit être mis en œuvre par tous moyens disponibles au bénéfice de toute personne. Les professionnels, les établissements et réseaux de santé, les organismes d'assurance maladie ou tous autres organismes participant à la prévention et aux soins, et les autorités sanitaires contribuent, avec les usagers, à développer la prévention, garantir l'égal accès de chaque personne aux soins nécessités par son état de santé et assurer la continuité des soins et la meilleure sécurité sanitaire possible. »
9. Cf. Andorno R, *La Bioéthique et la dignité de la personne*, PUF, 1997.
10. Responsabilité affirmée par ailleurs (art. L. 1411-1 CSP) qui implique la définition d'une véritable politique de santé selon des objectifs pluriannuels.

cacité est reconnue et qui garantissent la meilleure sécurité sanitaire au regard des connaissances médicales avérées. Les actes de prévention, d'investigation ou de soins ne doivent pas, en l'état des connaissances médicales, lui faire courir de risques disproportionnés par rapport au bénéfice escompté. »
Les principes éthiques de non malfaisance (*primum non nocere*, selon Hippocrate) et de bienfaisance, traduits dans la pratique médicale quotidienne par le souci d'optimiser le rapport bénéfice/risques de toute stratégie diagnostique ou thérapeutique, figurent dans le Code de déontologie médicale : « [...] le médecin s'engage à assurer personnellement au patient des soins consciencieux, dévoués et fondés sur les données acquises de la science [...] » [11]. Ainsi sont affirmées les obligations d'exploiter les données scientifiques et médicales obtenues par des méthodes rigoureuses d'évaluation et par là dotées d'un haut niveau de preuve, et de respecter les principes de proportionnalité et de sécurité sanitaire.
Le principe de proportionnalité s'applique aussi lors de la prise en charge du malade à l'agonie, conformément au principe proposé par la commission en charge de la préparation de la loi relative aux droits des malades et à la fin de vie [12] : « accepter la mort, respecter la vie ». L'article L. 1110-5 du CSP a été complété comme suit : « Ces actes [médicaux] ne doivent pas être poursuivis par une obstination déraisonnable. Lorsqu'ils apparaissent inutiles, disproportionnés ou n'ayant d'autre effet que le seul maintien artificiel de la vie, ils peuvent être suspendus ou ne pas être entrepris. Dans ce cas, le médecin sauvegarde la dignité du mourant et assure la qualité de sa vie en dispensant » des soins palliatifs.
Est ainsi affirmé pour les médecins « le droit à laisser mourir », bien distinct d'un acte destiné à « faire mourir ».

3. Droit au traitement de la douleur, à l'accompagnement en fin de vie, et aux soins palliatifs

Est également consacré [13] le droit du patient « de recevoir des soins visant à soulager sa douleur. Celle-ci doit être en toute circonstance prévenue, évaluée, prise en compte et traitée ».
Cette responsabilité des professionnels de santé s'applique notamment aux malades en fin de vie puisqu'ils sont invités à mettre « en œuvre tous les moyens à leur disposition pour assurer à chacun une vie digne jusqu'à la mort », en prenant en compte non seulement les besoins physiologiques, mais aussi les besoins psychologiques et spirituels de la personne en fin de vie. Le droit pour toute personne malade dont l'état le requiert d'accéder à des soins palliatifs et à un accompagnement est également affirmé [14].

11. Article 32 du Code de déontologie médicale et article R. 4127-32 du Code de la santé publique, expression voisine de celle du célèbre arrêt Mercier qui précise les obligations contractuelles du médecin : « soins consciencieux, attentifs, conformes aux données acquises de la science » (Cassation civile, 20 mai 1936).
12. Loi du 22 avril 2005 (JO du 23 avril).
13. Article L. 1110-5 du CSP.
14. Article L. 1110-9 du CSP.

B. Droit au respect inconditionnel, sans discrimination, de la dignité de la personne, et de son intimité

1. Droit au respect de la dignité de la personne [15]

L'article L. 1110-2 du CSP est rédigé ainsi : « La personne malade a droit au respect de sa dignité. » Parce que le malade peut se trouver dans un état de faiblesse, de vulnérabilité et de dépendance, le législateur a voulu souligner le respect inconditionnel qu'il mérite. Son statut d'usager du système de santé, sa position de patient dans les relations avec praticiens et soignants, et même ses déficiences, y compris celles qui diminuent son état de conscience, n'enlèvent rien à son identité de personne, individu appartenant à l'espèce humaine, et donc être digne. La notion de dignité est vague, mais puissante, puisqu'elle est le fondement de nos démocraties ; son intelligibilité est indiscutée, tant au niveau juridique que politique. C'est une intuition commune qui ne requiert pas de démonstration : toute personne est « digne » et donc titulaire des droits fondamentaux, du seul fait de son appartenance à l'humanité : la dignité est la valeur que l'on reconnaît à toute personne, du seul fait d'exister. Quel que soit le fondement philosophique de ce principe, il est admis de manière consensuelle et affirmé : toute personne a une valeur unique, indépendamment de ses qualités ; et personne ne peut être relevé du devoir de respect qui en découle. [16] Placé incomparablement au-dessus de toutes choses, l'homme est digne ; et de fait, le droit distingue radicalement deux catégories, les personnes et les choses [17].
La dignité est donc un droit auquel on ne peut déroger, un droit intangible qui ne peut être concilié avec d'autres principes (par opposition avec les autres droits ou libertés qui ne sont jamais absolus, mais limités ou relatifs), ou plutôt, même, la source de tous les droits.
Ce droit au respect de la dignité de la personne doit être assuré à tous les instants de la relation avec le malade, dans toutes les circonstances et étapes de la prise en charge, y compris, précise la loi, lors des actes réalisés, avec le consentement du patient, dans le cadre d'un enseignement clinique avec des étudiants [18].

2. Principe de non-discrimination dans l'accès à la prévention ou aux soins [19]

Le principe de non-discrimination – ou d'égalité de traitement [20] – dérive de cette notion de dignité ontologique, qualité intrinsèque de toute personne humaine,

---

15. Cf. Andorno R, *La Bioéthique et la dignité de la personne*, PUF, 1997.
16. Cependant, récemment, une autre vision, fondée sur le relativisme éthique, conditionnerait la dignité de la personne à son identité d'être auto-conscient, en substituant la notion de dignité par celle de qualité de vie et en faisant prévaloir la qualité de vie. Ce terme ambigu peut alors être utilisé par certains pour signifier qu'au-dessous d'un certain seuil (de qualité de vie, d'autonomie, de maîtrise de soi) certaines vies ne mériteraient pas d'être vécues.
17. Kant ajoute qu'alors que les choses ont un *prix*, les personnes ont une *dignité* ; ainsi chaque personne doit-elle être toujours traitée comme une fin, jamais comme un moyen.
18. Article L. 1111-4 du CSP.
19. Article L. 1110-3 du CSP : « Aucune personne ne peut faire l'objet de discriminations dans l'accès à la prévention ou aux soins. »
20. Le principe d'égalité a valeur constitutionnelle.

quels que soient l'âge, la race, le sexe, les conditions sociales ou économiques, la religion, etc. [21], et quels que soient la gravité et l'état d'avancement de la maladie. En d'autres termes, à besoin de santé égal, traitement égal [22].
Ainsi, dans les établissements de santé, des aménagements nécessaires à l'accueil des personnes souffrant d'un handicap physique, mental ou sensoriel (personnes sourdes ou malentendantes) doivent être prévus. Cette question de non-discrimination et d'égalité d'accès aux soins soulève celle de la prise en charge des personnes les plus démunies. L'accès au service public hospitalier leur est garanti. En particulier, pour les personnes qui ne relèvent ni de l'assurance maladie, ni de l'aide médicale de l'État, elles sont prises en charge par les établissements assurant le service public hospitalier en ce qui concerne les soins urgents, c'est-à-dire dans les situations mettant en jeu le pronostic vital ou qui pourraient conduire à une altération grave et durable de l'état de santé de la personne ou d'un enfant à naître.

3. Droit au respect de la vie privée et du secret médical [23]

Le respect de la dignité de la personne comprend le respect de sa vie privée [24], de son intimité, et suppose le caractère confidentiel de toutes les informations relatives à sa santé physique et mentale. Ce respect s'impose non seulement au médecin traitant et aux personnes appelées à prendre en charge le patient, mais aussi à tous les professionnels de santé et collaborateurs qui exercent au sein d'un établissement, d'un réseau de santé ou de tout autre organisme participant à la prévention et aux soins.
Lors d'une hospitalisation, le respect de l'intimité de la personne doit être préservé à tout moment du séjour hospitalier, lors des soins, des toilettes, des consultations et des visites médicales, des traitements pré- et postopératoires, des radiographies, des brancardages, etc. Si un enseignement clinique conduit à l'examen du patient en présence d'étudiants, son consentement préalable est requis. Il ne peut être passé outre le refus de la personne.
Le secret professionnel constitue l'une des plus anciennes obligations des professionnels de santé ; institué dans l'intérêt du patient, il figure dans tous les codes de déontologie et sa violation est pénalement sanctionnée [25]. Il s'impose à tous, même s'il peut être partagé entre professionnels de santé, toujours dans l'intérêt du patient (on parle alors de secret partagé).
Il couvre l'ensemble des informations concernant la personne venue à la connaissance du professionnel de santé, de par ses activités.
En cas de diagnostic ou de pronostic grave, le secret médical ne s'oppose pas à ce que la famille ou les proches de la personne malade reçoivent les informations nécessaires destinées à leur permettre d'apporter un soutien direct à celle-ci, sauf en cas de refus de sa part.

21. Les codes civil et pénal ajoutent les caractéristiques génétiques.
22. Il s'agit du principe d'équité horizontale.
23. Article L. 1110-4 du CSP.
24. Cf. article 9 du Code civil : « Chacun a droit au respect de sa vie privée. »
25. Article 226-13 du Code pénal : « La révélation d'une information à caractère secret par une personne qui en est dépositaire soit par état ou par profession, soit en raison d'une fonction ou d'une mission temporaire, est punie d'un an d'emprisonnement et de 15 000 euros d'amende. »

D'autres règles visent par ailleurs à sécuriser la conservation et les échanges des données médicales informatisées.

C. Droit du malade au libre choix de son praticien et de son établissement de santé

Le principe constitutionnel de liberté individuelle est décliné ici comme la liberté du patient quant au choix de son praticien et de son établissement de santé [26]. Défini « comme un principe fondamental de la législation sanitaire », il a également son pendant dans un article législatif du Code de la Sécurité sociale [27].
Il ne s'agit cependant pas d'un principe absolu, mais d'un droit limité et contingent, c'est-à-dire dépendant de toute une série de circonstances et de paramètres organisationnels, administratifs, matériels, techniques et financiers. Ainsi doit-il être concilié, et le cas échéant subordonné, aux règles définies par les autorités sanitaires et sociales : « Les limitations apportées à ce principe par les différents régimes de protection sociale ne peuvent être introduites qu'en considération des capacités techniques des établissements, de leur mode de tarification et des critères de l'autorisation à dispenser des soins remboursables aux assurés sociaux. »
L'affirmation de ce droit peut aussi être rapprochée d'un autre article qui figure peu après, l'article L. 1111-1, et rappelle que la liberté a pour corollaire la responsabilité : « Les droits reconnus aux usagers s'accompagnent des responsabilités de nature à garantir la pérennité du système de santé et des principes sur lesquels il repose. » En tant qu'assuré social, en effet, le patient participe à un système de protection sociale fondé sur la solidarité. Pour que tous les assurés sociaux puissent continuer à bénéficier du financement socialisé de la Sécurité sociale, concilié, depuis 1945, avec les libertés médicales, chacun doit en user à bon escient et avoir le souci de ne pas en abuser.

D. Droit spécifique : droit des enfants hospitalisés à un suivi scolaire adapté

Enfin, la loi du 4 mars 2002 a ajouté dans ce chapitre préliminaire du Code de la santé publique un droit nouveau, le droit pour les enfants en âge scolaire, dont les conditions d'hospitalisation le permettent, à un suivi scolaire adapté au sein des établissements [28].

---

26. Article L. 1110-8 du CSP.
27. C'est « dans l'intérêt des assurés sociaux et de la santé publique », que les libertés médicales, et parmi elles le libre choix du médecin par le malade, sont consacrées d'une autorité législative (art. L. 162-2 du Code de la Sécurité sociale).
28. Article L. 1110-6 du CSP.

III. Droit à l'information et au consentement

En raison de sa dignité de personne humaine, le patient est titulaire du droit d'être informé sur son état de santé et du droit d'exprimer sa volonté quant aux stratégies diagnostiques et thérapeutiques à mettre en œuvre.

A. Droit à l'information

1. Information relative à l'état de santé

Le devoir d'information concerne tout professionnel de santé [29] dans le cadre de ses compétences et dans le respect des règles professionnelles qui lui sont applicables. Seules l'urgence de l'intervention ou l'impossibilité (coma, inconscience, handicap mental) peuvent les en dispenser.

Le contenu de cette information est précisé par la loi. D'après l'article L. 1111-2 du CSP, l'information porte sur l'état de santé du patient, les différentes investigations, les traitements ou actions de prévention, leur utilité, leur urgence éventuelle, leurs conséquences, les risques fréquents ou graves normalement prévisibles [30], les autres solutions possibles, et les conséquences prévisibles en cas de refus. Elle s'étend aussi aux risques nouveaux identifiés *a posteriori*. Le patient doit donc également en être informé [31], sauf en cas d'impossibilité de le retrouver.

C'est au cours d'un entretien individuel qu'une information loyale, claire et appropriée doit être délivrée au patient ou à la personne de confiance (parent, proche ou médecin traitant, désignée par écrit) [32]. Des recommandations de bonnes pratiques sur la délivrance de l'information précisent par ailleurs que celle-ci doit être adaptée et personnalisée, et qu'il convient de veiller à la compréhension des explications données.

S'agissant des mineurs et majeurs sous tutelle, l'information doit être transmise aux titulaires de l'autorité parentale ou aux tuteurs ; mais elle doit également être donnée de manière adaptée aux intéressés [33].

---

29. Le Code de la santé publique distingue :
   – professions médicales : médecin, chirurgien-dentiste, sage-femme ;
   – professions de la pharmacie : pharmacien, préparateur en pharmacie ;
   – auxiliaires médicaux : infirmier, masseur-kinésithérapeute et pédicure-podologue, ergothérapeute et psychomotricien, orthophoniste et orthoptiste, manipulateur d'électroradiologie médicale, audioprothésiste et opticien-lunetier, prothésiste et orthésiste pour l'appareillage des personnes handicapées, diététicien.
30. Les risques rares n'ont donc pas à être mentionnés.
31. Cela suppose pour les professionnels ou les établissements des obligations quant à la gestion et à l'archivage des données et des dossiers médicaux, et quant à la traçabilité des produits de santé.
32. Article L. 1111-6 du CSP : « Toute personne majeure peut désigner une personne de confiance qui peut être un parent, un proche ou le médecin traitant, et qui sera consultée au cas où elle-même serait hors d'état d'exprimer sa volonté et de recevoir l'information nécessaire à cette fin. Cette désignation est faite par écrit. Elle est révocable à tout moment. Si le malade le souhaite, la personne de confiance l'accompagne dans ses démarches et assiste aux entretiens médicaux afin de l'aider dans ses décisions. Lors de toute hospitalisation dans un établissement de santé, il est proposé au malade de désigner une personne de confiance dans les conditions prévues à l'alinéa précédent. »
33. Article L. 1111-2 du CSP.

La volonté d'une personne d'être tenue dans l'ignorance d'un diagnostic ou d'un pronostic doit être respectée, sauf lorsque des tiers sont exposés à un risque de transmission.
En cas de litige, il appartient au professionnel ou à l'établissement de santé d'apporter la preuve que l'information a été délivrée à l'intéressé dans les conditions prévues par la loi.

2. Information relative aux dépenses de santé

De plus, toute personne a droit à une information sur les frais des prestations de santé qui pourraient être laissés à sa charge, ainsi que sur les conditions de remboursement par les régimes obligatoires d'assurance maladie [34].

3. Droit d'accès direct au dossier médical

L'ensemble des informations relatives à sa santé sont rendues accessibles au patient [35], soit directement, soit par l'intermédiaire d'un médecin qu'il désigne [36].
La présence d'une tierce personne lors de la consultation de certaines informations peut être recommandée par le médecin les ayant établies ou en étant dépositaire, pour des motifs tenant aux risques que leur connaissance sans accompagnement ferait courir à la personne concernée. Cet accès direct au dossier peut être aménagé à la demande du médecin, ainsi que pour les mineurs et majeurs sous tutelle.
Le patient peut obtenir communication des données médicales le concernant dans un délai prévu par la loi ; les frais relatifs au coût de la reproduction et à l'envoi des documents sont laissés à sa charge.
La personne est de plus propriétaire de son dossier médical en tant qu'ensemble des informations médicales formalisées.

B. Droit au consentement : l'expression de la volonté du patient

La décision médicale ne doit pas être imposée de manière unilatérale, mais doit être partagée.
L'article L. 1111-4 du CSP affirme la place prépondérante du patient : « Toute personne prend, avec le professionnel de santé et compte tenu des informations et des préconisations qu'il lui fournit, les décisions concernant sa santé. » On peut ainsi parler d'un droit à la codécision.
Le consentement libre et éclairé de la personne est requis pour tout acte médical ou traitement. Le consentement doit être libre, c'est-à-dire ne pas avoir été obtenu sous la contrainte. Il doit être éclairé, c'est-à-dire que la personne doit avoir été préalablement informée des actes qu'elle va subir, des risques fréquents ou graves normalement prévisibles et des conséquences que ceux-ci pourraient entraîner. Le consentement peut être retiré à tout moment ; la personne peut refuser un acte ou

34. Article L. 1111-3 du CSP.
35. À l'exception des informations mentionnant qu'elles ont été recueillies auprès de tiers n'intervenant pas dans la prise en charge thérapeutique ou concernant un tel tiers.
36. Article L. 1111-7 du CSP.

un traitement ou en demander l'interruption. Si la volonté de la personne de refuser ou d'interrompre un traitement met sa vie en danger, le médecin doit tout mettre en œuvre pour la convaincre d'accepter les soins indispensables.
Le consentement du mineur ou du majeur sous tutelle doit être systématiquement recherché s'il est apte à exprimer sa volonté et à participer à la décision. À défaut, des règles prévoient un aménagement du recueil du consentement. De même, pour les personnes hors d'état d'exprimer leur volonté, c'est la personne de confiance désignée, ou à défaut la famille ou un proche, qui sera consultée.
Des règles particulières concernent l'expression de la volonté des malades en fin de vie (art. L. 1111-10 à L. 1111-13 CSP) :

- droit du patient en phase avancée ou terminale d'une affection grave et incurable de décider de limiter ou d'arrêter tout traitement ;
- pour les malades incapables d'exprimer leur volonté :
  - importance des éventuelles directives anticipées rédigées par le patient et datant de moins de trois ans, indiquant ses souhaits quant à sa fin de vie et les conditions de la limitation ou l'arrêt de traitement,
  - place prépondérante de l'avis de la personne de confiance désignée.

De même un consentement spécifique est prévu pour certains actes :

- recherche biomédicale,
- assistance médicale à la procréation,
- don et utilisation des éléments et produits du corps humain,
- interruption volontaire de grossesse,
- réalisation des examens des caractéristiques génétiques et de certains tests de dépistage (VIH par exemple).

Conclusion

La formulation explicite des droits des patients tels qu'ils figurent depuis 2002 dans la partie législative du Code de la santé publique répond sur le plan juridique aux attentes des patients vis-à-vis du système de santé et suppose un nouveau type de relations patients/professionnels de santé. S'opposant à un modèle basé sur la confiance et critiqué pour son « paternalisme », les nouvelles règles relatives à l'information et au consentement visent une adaptation aux évolutions sociologiques de la société, compte tenu notamment de la large diffusion des informations scientifiques et médicales.
À la suite de nombreux auteurs [37], qu'il nous soit permis de souligner le déséquilibre entre l'affirmation des droits et celle des devoirs : la mention d'obligations figure à peine dans le code ; un seul bref article de principe [38] évoque « les responsabilités [des patients] de nature à garantir la pérennité du système », dans des termes si vagues et généraux qu'ils n'ont guère de portée. Or, si la personne humaine est titulaire de droits, elle l'est aussi de devoirs ; et la solidarité sup-

37. Notamment Hœrni B., Bénézech M., « Les devoirs des patients », *La Presse médicale* 2004 ; 33 : 80-82.
38. Article L. 1111-1 du CSP.

pose le respect d'autrui, en l'occurrence, de la part du patient, à l'égard des professionnels de santé et des autres patients. L'omission de ces principes ne risque-t-elle pas de se traduire par une montée du consumérisme ? Et cette judiciarisation des relations soignant/soigné ne risque-t-elle pas d'entraîner des relations entachées de méfiance ? Il n'est pas certain qu'une telle tendance concoure à l'intérêt des patients.
Dès 1994, le Bureau régional de l'Organisation mondiale de la santé pour l'Europe encourageait chaque État membre à introduire des dispositions législatives sur les droits et les devoirs des patients, des professionnels de santé et des établissements de soins, en vue de « favoriser chez les individus une prise de conscience de leurs responsabilités » et d'« instaurer dans les relations patients/soignants un climat de confiance et de respect mutuel » [39]. Puisse le dispositif juridique présenté ci-dessus effectivement faciliter dialogue, partenariat, coopération, et se traduire par une amélioration de la qualité des soins et par un gain en termes d'humanisation.

L'essentiel de la question

En modifiant le Code de la santé publique, la loi du 4 mars 2002 relative aux droits des patients a clarifié, harmonisé et renforcé ces droits. Plusieurs d'entre eux étaient déjà consacrés dans le droit français par de nombreuses normes juridiques, et trouvent leurs racines dans l'éthique médicale traditionnelle. De nouveaux droits, principalement dans le domaine de l'information et du consentement, ont été introduits.
Les droits de la personne énoncés par les premiers articles de la partie législative du Code de la santé publique sont les suivants :

1. Droit à la protection de la santé à mettre en œuvre par tous moyens disponibles.
2. Droit aux soins les plus appropriés.
3. Droit au traitement de la douleur, à l'accompagnement en fin de vie, et aux soins palliatifs.
4. Droit au respect de la dignité de la personne.
5. Droit à la non-discrimination dans l'accès à la prévention ou aux soins.
6. Droit au respect de la vie privée et du secret médical.
7. Droit du patient au libre choix de son praticien et de son établissement de santé.
8. Droit spécifique : droit des enfants hospitalisés à un suivi scolaire adapté.

Par ailleurs, tout patient a droit, sauf en cas d'urgence ou d'impossibilité, à recevoir lors d'un entretien individuel une information loyale, claire et appropriée sur son état de santé, les investigations, les traitements ou actions de prévention, leur utilité, leur urgence éventuelle, leurs conséquences, les risques fréquents ou graves normalement prévisibles, les autres solutions possibles, et les conséquences prévisibles en cas de refus. Ce droit à l'information s'étend aussi aux risques nouveaux identifiés *a posteriori*. Mais le patient a également le droit de vouloir rester dans l'ignorance d'un diagnostic ou d'un pronostic.

---

39. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe, « Déclaration sur la promotion des droits des patients en Europe », Amsterdam, mars 1994.

En cas de litige, c'est au professionnel de santé d'apporter la preuve que l'information a été donnée. Le patient a aussi un droit d'accès direct à son dossier médical dont il est propriétaire.
Il a par ailleurs également le droit d'être informé sur le coût des thérapeutiques et les conditions de prise en charge par les organismes de protection sociale.
Le patient doit être acteur de sa prise en charge et associé au processus décisionnel. Un consentement libre et éclairé est requis pour tout acte médical ou traitement, et est susceptible d'être retiré à tout moment. Pour recevoir l'information et participer à la décision, le patient peut désigner par écrit une personne de confiance. Des règles spécifiques organisent la transmission d'information et le recueil du consentement pour les mineurs, les majeurs sous tutelle, et les personnes hors d'état d'exprimer leur volonté.
La loi du 22 avril 2005 relative aux droits des malades et à la fin de vie a complété le dispositif en affirmant le droit à limiter ou arrêter les traitements et l'importance de l'expression de la volonté du malade.

Pour en savoir plus

- Charte de la personne hospitalisée. Circulaire DHOS/E1/DGS/SD1B/SD1C/SD4A/2006/90 du 2 mars 2006. Disponible sur le site du ministère de la Santé : www.sante.gouv.fr
- Ponchon F. Les Droits des patients à l'hôpital. PUF, 2002.
- Moreau J., Truchet D. Droit de la santé publique, 6e éd. Dalloz, Mémentos, 2004 : 203-17.
- Dupont M., Esper C., Paire C. Droit hospitalier, 5e éd. Dalloz, 2005 : 497-589.
- Clément J.-M. Les Grands Principes du droit de la santé. Les Études hospitalières, 2005.

Biophysique, chimie organique et chimie analytique

Principales fonctions organiques Définition et réactivité

D. FLORENTIN, Laboratoire de chimie organique, UFR des sciences pharmaceutiques, Caen.

Cet article n'a pour but que de rappeler quelques propriétés principales de fonctions inscrites au programme de l'internat en pharmacie.

I. Alcools, phénols

Composés possédant le même groupement fonctionnel –OH appelé hydroxyle.

A. Alcools : R–OH

Il existe trois classes d'alcools suivant le nombre de substituants portés par le carbone lié au groupement hydroxyle.

```
   H              R              R
   |              |              |
R—C—OH         R—C—OH         R—C—OH
   |              |              |
   H   I          H   II         R   III
```

La nomenclature officielle consiste à faire suivre le nom de l'hydrocarbure correspondant du suffixe-*ol* (CH_3–CH_2OH : éthanol, nom commun : alcool éthylique).

1. Structure

L'oxygène est lié à un carbone d'hydridation sp^3, la liaison –O–H est très polarisée en raison de l'effet électro-attracteur de l'oxygène.

$$R-\overline{\underline{O}}-H \quad (\delta^- \text{ sur O}, \ \delta^+ \text{ sur H})$$

2. Propriétés physiques

Formations de liaisons hydrogène :

- Entre molécules d'alcool

```
|Ō—H||||Ō—H||||Ō—H
 |       |       |
 R       R       R
```

Conséquence : des points d'ébullition élevés : CH_3OH, 65 °C ; C_2H_5OH, 78,5 °C.

- Entre molécules d'alcool et molécules d'eau.
  Conséquence : une solubilité dans l'eau élevée (cette solubilité dans l'eau diminue lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente).

3. Réactivité

- Les alcools sont des acides faibles : l'acidité dépend des effets inducteurs des substituants portés par le carbone lié à l'hydroxyle.

$$CH_3 \rightarrow CH_2-OH \quad pKa = 15{,}9 \qquad (CH_3)_3 \rightarrow C-OH \quad pKa = 19{,}2$$

$$F_3C \leftarrow CH_2-OH \quad pKa = 12{,}4$$

Conséquence : formation d'alcoolates par action de sodium, potassium ou hydrures métalliques.

$$2ROH + 2Na \rightarrow 2RO^-Na^+ + H_2$$

- Ce sont d'autre part des bases faibles, un doublet d'électrons libres sur l'oxygène pouvant fixer un proton :

$$R-\overline{O}-H + H^+ \rightleftharpoons R-\overset{+}{O}H_2$$

- L'ion formé peut évoluer par substitution ou par élimination. Ainsi en présence d'hydracides (halogénures d'hydrogène), il se produit une substitution nucléophile par l'ion X^- (SN1 ou SN2 suivant la classe de l'alcool).

$$R\text{–}OH + HX \rightarrow R\text{–}X + H_2O$$

- En présence d'un acide fort (H_2SO_4) et par chauffage, il y a élimination (E1 ou E2) :

$$R_1-CH_2-CHOH-R_2 \xrightarrow[\Delta]{H^+} R_1-CH=CH-R_2$$

(Se réalise aussi en présence de bases.)

- Les alcools peuvent former des esters organiques par action d'acides carboxyliques (réaction équilibrée).

$$R_1OH + R_2\,COOH \rightleftharpoons R_1-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-R_2 + H_2O$$

Pour déplacer cet équilibre vers la production d'ester, on peut éliminer l'eau au fur et à mesure de sa formation ou, mieux, remplacer l'acide par son chlorure ou son anhydride.

- Par action d'acides minéraux, il y a formation d'esters minéraux (nitrates d'alkyle : $RONO_2$, sulfates acides : $ROSO_3H$, monophosphate : $ROPO_3H_2$, diphosphate, triphosphate…).

- L'action d'un alcoolate sur un halogénure d'alkyle conduit à un éther oxyde.

$$RO^-Na^+ + R_1X \rightarrow R{-}O{-}R_1 + Na^+X^-$$

Cette réaction est aussi possible par chauffage de l'alcool en présence d'acide minéral.

$$2C_2H_5OH \xrightarrow[\Delta]{H_2SO_4} C_2H_5{-}O{-}C_2H_5$$

diéthyle oxyde (éther éthylique)

- Enfin, les alcools primaires et secondaires peuvent être respectivement oxydés en aldéhydes et cétones à l'aide d'acide chromique $H_2CrO_4(K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4)$ ou de permanganate de potassium $KMnO_4$.

$$R_1R_2CH{-}OH \longrightarrow R_1R_2C{=}O$$

$$R_1{-}CH_2OH \longrightarrow R_1{-}CHO \longrightarrow R_1{-}COOH$$

risque d'oxydation en acide

B. Phénols : ArOH

Ils portent généralement un nom commun. On peut aussi les désigner par le préfixe *hydroxy*- suivi du nom du carbure aromatique.

phénol = hydroxybenzène

o. crésol = o. hydroxytoluène

1. Structure

L'oxygène est lié à un carbone d'hybridation sp^2. Un doublet d'électrons libres de l'oxygène peut se délocaliser vers le cycle.

La polarisation de la liaison O–H sera donc plus intense que dans le cas des alcools, et le proton pourra se détacher plus facilement.

Conséquence au niveau du noyau : le groupement hydroxyle est activateur et oriente les substitutions électrophiles en para et en ortho.

2. Propriétés physiques

Les liaisons hydrogène sont plus marquées que celles des alcools : les points de fusion et d'ébullition seront donc plus élevés (le phénol est solide à température ambiante). En revanche, en raison de la présence du cycle aromatique, la solubilité dans l'eau sera plus faible.

3. Réactivité

- L'acidité des phénols est supérieure à celle des alcools (phénol : pKa = 9,9), par addition de bases formation de phénates équivalents d'alcoolates mais cependant beaucoup plus stables dans l'eau.

$$ArOH + NaOH \rightarrow ArONa + H_2O$$

- Les réactions d'estérification et de formation d'éthers oxydes sont du même type que celles des alcools.

  Exemple : $ArONa + R_1X \rightarrow ArOR_1 + X^-Na^+$

- Le groupement hydroxyle est par contre difficilement substituable (ex. : pas d'action des hydracides).
- La présence de ce groupe OH facilite l'oxydation du noyau (air, oxygène).

  Exemple du phénol :

$$C_6H_5-OH \xrightarrow{O_2} O{=}C_6H_4{=}O + H_2O$$

- Rupture au niveau du cycle par action de $KMnO_4$

$$\text{Phénol} \rightarrow HOOC{-}CH{=}CH{-}CH{=}CH{-}COOH$$

acide hexa-2,4-diène-1,6-dioïque

- Propriétés du noyau : réactions de substitutions électrophiles (S.E.) nombreuses et assez faciles.

  Exemple : halogénation du phénol par le chlore

Phénol (OH en 1 ; positions 2, 3, 4, 5, 6) $\xrightarrow{Cl_2}$ 2-chlorophénol (ortho) + 4-chlorophénol (para) → 2,4-dichlorophénol → pentachlorophénol

OH, Cl, ortho, para

Avec le brome dans l'eau formation du 2,4,6-tribromophénol qui précipite.

OH
Br Br
Br

Monosubstitution du phénol : quelques exemples de S.E. :

OH

HNO_3 dilué → OH / NO_2 + OH / NO_2

H_2SO_4 conc. → OH / SO_3H + OH / SO_3H

1) NaOH, ICH_3
2) RX + acide Lewis
ou ROH + H^+
ou alcènes + H^+
3) HI Δ
→ OH / R + OH / R

Exemples de réactions de S.E. propres au phénol :

$NaNO_2/HCl$ → p. nitrosophénol (OH, N=O) — H_2SO_4 conc. → oxime de la para benzoquinone (O, N−OH)

anh. phtalique, H^+ → phénolphtaléine

1) $CHCl_3$, KOH en excès, Reimer Tieman, 2) H^+ → aldéhyde salicylique (OH, CHO)

1) Na, 2) CO_2, pression, 3) $\Delta < 140$ °C, Kolbe Schmitt, 4) H^+ → acide salycylique (OH, COOH)

1) pH ≈ 9, $^+N{=}N{-}C_6H_5$, 2) H^+ → p. hydroxyazobenzène (HO−C₆H₄−N=N−C₆H₅)

II. Amines

A. Amines aliphatiques : R–N̄<

Ce sont des dérivés de l'ammoniac par remplacement d'un, deux ou trois hydrogènes par des radicaux alkyles. On distingue ainsi les amines primaires, secondaires et tertiaires.

$R-\bar{N}H_2$ (I) $\quad$ $R-\bar{N}H$ avec R (II) $\quad$ $R-N|$ avec R, R (III)

La nomenclature officielle fait précéder le nom de la chaîne principale du préfixe *amino-*.

$CH_3-CH(NH_2)-CH_2-CH_3$ 2-aminobutane

Dans le cas des amines secondaires et tertiaires, les noms des groupements alkyles précèdent le terme *amine*.

$(CH_3)(C_2H_5)(nC_3H_7)N|$ éthyl méthyl n propylamine

1. Structure

L'atome d'azote est trivalent et d'hybridation sp^3 (une orbitale sp^3 contient le doublet libre d'électrons).

NR_3 (pyramidal, doublet libre)

2. Propriétés physiques

Les amines primaires et secondaires peuvent former des associations moléculaires par liaisons hydrogène, mais l'azote est moins électronégatif que l'oxygène, et les liaisons seront donc plus faibles que celles entre alcools.
Les premiers termes sont gazeux, puis liquides, enfin solides. Les premiers termes sont solubles dans l'eau.
Les amines tertiaires qui ne peuvent s'associer ont des points d'ébullition voisins de ceux des hydrocarbures analogues.
Il n'y a pas d'isomérie optique dans le cas d'amines tertiaires possédant trois groupes alkyle différents.

3. Réactivité

- Les amines sont, comme l'ammoniac, des bases (par leur doublet libre, elles peuvent fixer un proton, ou fournir ce doublet libre : bases de Lewis).
  La basicité des amines dépend des groupements fixés sur l'azote, les groupements donneurs augmentent la basicité, les groupements attracteurs la diminuent.

$$CH_3 \rightarrow \bar{N}H_2 \quad pKb = 3{,}36 \qquad (CH_3)_2\bar{N}H \quad pKb = 3{,}29$$

  L'encombrement stérique intervient dans les amines tertiaires, moins basiques que les amines secondaires.

$$(CH_3)_3N| \quad pKb = 4{,}26$$

  Conséquence : formation de sels d'alkylammonium avec les acides forts et aussi avec les acides organiques.

$$RNH_2 + HCl \rightarrow R\text{–}N^+H_3Cl^-$$

  (On profite de cette propriété pour séparer les énantiomères d'un acide racémique : salification par l'amine chirale, formation de deux diastéréo-isomères séparables.)

- Les amines primaires et secondaires qui possèdent des hydrogènes sont des acides faibles (acidité inférieure à celle des alcools)

$$R_2\bar{N}H \quad pKa \approx 35$$

  Cette propriété permet de former des sels métalliques par action de métaux alcalins ou de bases fortes.

$$R_2\bar{N}H + NaNH_2 \longrightarrow R_2\bar{N}|^- Na^+ + NH_3$$

- Par action de chlorures ou d'anhydrides d'acides sur les amines primaires ou secondaires, il y a formation d'amides solides à PF caractéristiques (réaction d'acylation) : amines nucléophiles.

$$R\text{—}COCl + R_1NH_2 \longrightarrow R\text{—}C(=O)\text{—}NH\text{—}R_1$$

- L'action d'halogénures d'alkyle puis d'une base conduit à l'alkylamine de classe supérieure.

$$RNH_2 + R_1Cl \longrightarrow (R)(R_1)N^+H_2\ Cl^- \xrightarrow{NH_3} (R)(R_1)NH + H_4N^+Cl^-$$

De même, l'action d'un halogénure sur une amine tertiaire conduit à l'ammonium quaternaire (plus de doublet libre, une charge positive et, si les quatre groupements alkyles sont différents, on retrouve une isomérie optique). Par action d'oxyde d'argent en milieu aqueux puis chauffage, formation d'une amine tertiaire et d'un éthylénique.

$$(CH_3)_3N| + nC_4H_9I \longrightarrow (CH_3)_3N^+-nC_4H_9\ I^- \xrightarrow[H_2O]{Ag_2O} (CH_3)_3\overset{+}{N}-CH_2CH_2CH_2CH_3\ {}^-OH$$

$$\xrightarrow{\Delta} (CH_3)_3N| + H_2O + H_2C{=}CH-CH_2-CH_3$$

Attention, formation de l'éthylénique le moins substitué (Hofmann)

- Les amines primaires, secondaires et tertiaires peuvent être différenciées les unes des autres par action de l'acide nitreux (formé à 0 °C à partir de nitrite de sodium $NaNO_2$ et d'un acide fort). Les amines primaires donnent un alcool, les amines secondaires un dérivé nitrosé (nitrosamine), les amines tertiaires ne réagissent pas. Exemple : amine I.

$$R\bar{N}H_2 + HO\bar{N}O \xrightarrow{HCl} R-\bar{N}{=}\bar{N}^+Cl^- \xrightarrow{H_2O} ROH + N_2\uparrow$$

Le diazoïque formé est instable (réaction de désamination nitreuse).

- Enfin, il faut citer la formation de N oxydes à partir d'amines tertiaires et d'eau oxygénée, et la formation d'imines avec les amines primaires et les dérivés carbonylés.

$$R_3N| + H_2O_2 \longrightarrow R_3N^+-\bar{\underline{O}}|^-$$

$$R_1\bar{N}H_2 + {>}C{=}O \longrightarrow R_1-\bar{N}{=}C{<}$$

B. Amines aromatiques : ArN<

Nomenclature : préfixe amino placé devant le nom du carbure

$C_6H_5-NH_2$ amino benzène (nom commun : aniline)

1. Structure

L'azote fixé sur le noyau aromatique a une hybridation sp^2, l'orbitale p non hybridée contient le doublet d'électrons qui peut se délocaliser vers le cycle aromatique.

Conséquence : activation du cycle, substitutions électrophiles en para et en ortho.

2. Réactivité

- Le doublet d'électrons libres étant délocalisé vers le cycle aromatique est moins disponible pour accaparer un proton, la basicité sera donc plus faible que celle des amines aliphatiques (exemple, aniline : pKb = 9,4). La formation de sels est plus difficile et la réaction de salification est réversible (dans le sel, il n'y a plus de conjugaison possible avec le cycle).

$$ArNH_2 + HCl \rightleftharpoons ArN^+H_3Cl^-$$

- Les réactions d'acylation et d'alkylation sont du même type qu'en série aliphatique.

$$C_6H_5-NH_2 + Cl-C(=O)-CH_3 \longrightarrow C_6H_5-NH-C(=O)-CH_3$$

acétanilide

- Avec les dérivés carbonylés (aldéhydes ou cétones) formation d'imines (bases de Schiff).

$$Ar-\bar{N}=C<$$

- L'action de l'acide nitreux conduit à 0 °C à la formation d'un diazoïque stable.

$$ArNH_2 + HO\bar{N}O \xrightarrow{HCl} Ar-\bar{N}=\bar{N}^+Cl^-$$

Les sels de diazonium obtenus permettent la synthèse de nombreux composés difficiles à obtenir par S.E. directe.
Exemples :

$$C_6H_5-\bar{N}=\bar{N}^+Cl^- \xrightarrow[\Delta]{KI} C_6H_5-I$$

$$C_6H_5-\bar{N}=\bar{N}^+Cl^- \xrightarrow[CuCN]{KCN} C_6H_5-CN$$

$$C_6H_5-\bar{N}=\bar{N}^+Cl^- \xrightarrow[2)\ \Delta]{1)\ HBF4} C_6H_5-F$$

- Les substitutions électrophiles sur le noyau sont nombreuses, elles se font en ortho et para et nécessitent souvent une protection du groupement aminé sous forme d'amide

(acétanilide C_6H_5—$NHCOCH_3$)

Exemples de monosubstitution en para (il se forme en même temps l'isomère ortho) :

C_6H_5—$NHCOCH_3$ $\xrightarrow[H_2SO_4]{HNO_3}$ O_2N—C_6H_4—$NHCOCH_3$

$\xrightarrow[AL]{Br_2}$ Br—C_6H_4—$NHCOCH_3$

$\xrightarrow[AL]{Cl_2}$ Cl—C_6H_4—$NHCOCH_3$

$\xrightarrow{HOSO_2Cl}$ $ClSO_2$—C_6H_4—$NHCOCH_3$

AL : acides de Lewis

Le groupement amide peut être hydrolysé en milieu acide, la réaction de sulfochloration conduit aux sulfochlorures employés dans la synthèse des sulfonamides.

$ClSO_2$—C_6H_4—$NHCOCH_3$ $\xrightarrow{H_3O^+}$ $ClSO_2$—C_6H_4—NH_2 $\xrightarrow{NH_3}$ H_2N—SO_2—C_6H_4—NH_2

- Par oxydation de l'aniline, il peut y avoir formation de p quinone.

III. Dérivés halogénés

A. Dérivés halogénés aliphatiques : R–X

Un halogène (ou plusieurs) remplace un hydrogène (ou plusieurs) d'un hydrocarbure saturé ou insaturé. Le nom de l'halogène précède le nom de l'hydrocarbure

$BrCH_2–CH_2–CH_3$ 1-bromo propane.

1. Dérivés halogénés saturés

a) Structure

L'halogène est fixé sur un carbone d'hydridation sp^3. L'halogène plus électronégatif que le carbone attire les électrons de la liaison

$$-\overset{|}{\underset{|}{C}}{}^{\delta+}-X^{\delta-}$$

La réactivité dépend de cette polarisation et surtout de la polarisabilité de la liaison C–X (fonction du volume de l'atome).
Ordre de réactivité : RI > RBr > RCl > RF.

b) Propriétés physiques

Les points d'ébullition (et les densités) sont plus élevés que ceux des alcanes correspondants, ils augmentent en fonction de la masse de l'halogène. Ils sont insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques.

c) Réactivité

- Les substitutions nucléophiles sont très nombreuses (SN1 ou SN2).
  Exemples :

$$RX \xrightarrow{HO^-} ROH + X^-$$
$$RX \xrightarrow{R_1O^-} R-O-R_1 + X^-$$
$$RX \xrightarrow{|NH_3} RN^+H_3X^-$$
$$RX \xrightarrow{R_1S^-} R-S-R_1 + X^-$$
$$RX \xrightarrow{|N\equiv C^-} R-C\equiv N| + X^-$$
$$RX \xrightarrow{R_1-C\equiv C^-} R-C\equiv C-R_1 + X^-$$

- En présence de bases fortes $NaNH_2$, KOH/C_2H_5OH, il y a élimination (E1 ou E2) et formation d'alcènes ou d'alcynes par arrachement d'un proton en β.

$$R-CH_2-CH(Br)-R_1 \longrightarrow R-CH=CH-R_1$$

$$R-CH(Br)-CH(Br)-R_1 \longrightarrow R-C\equiv C-R_1$$

- Les réactifs de Grignard (organomagnésiens) sont formés par action directe du métal sur l'halogénure d'alkyle – réaction à effectuer en présence d'un solvant anhydre (THF, éther éthylique) et sous gaz inerte (N_2, Argon).

$$R-X + Mg \xrightarrow[N_2]{THF} R-MgX$$

• Les lithiens sont formés de la même manière ; enfin, en présence de métaux très électropositifs tels que le sodium, il peut y avoir duplication (réaction radicalaire de Wurtz).

$$2RX + 2Na \rightarrow R\text{–}R + 2Na^+X^-$$

2. Dérivés halogénés insaturés

Ils sont de deux types.

a) Vinyliques

$$>C{=}C<_{\overline{X}|} \longleftrightarrow >C^{\ominus}\text{—}C{=}X^{+}$$

L'halogène est peu réactif.

b) Allyliques

$$>C{=}C<\text{–}C\text{–}\overline{X}| \xrightarrow{-X^-} >C{=}C<\text{–}C^+ \longleftrightarrow >C^+\text{—}C{=}C<$$

Ils sont très réactifs car le départ de l'halogène conduit à un carbocation stabilisé par résonance.

B. Dérivés halogénés aromatiques : $Ar(CH_2)nX$

Il faut distinguer les dérivés nucléaires (n = 0) et les extranucléaires ; ces derniers se comportent comme des dérivés aliphatiques, sauf les halogénés benzyliques (n = 1) qui possèdent des propriétés particulières.

1. Dérivés nucléaires

a) Structure

L'halogène est fixé directement sur le carbone sp^2 du noyau, ce qui permet la délocalisation d'un doublet d'électrons de l'halogène vers le cycle aromatique (effet + M > effet – I).

$$|\overline{X}\text{–}C_6H_5 \longleftrightarrow {}^{+}X{=}C_6H_5^{\ominus} \longleftrightarrow \ldots$$

Ce caractère partiel de double liaison rend l'halogène peu réactif (analogie avec les halogénés vinyliques). Les substitutions nucléophiles directes seront donc difficiles

à effectuer. Les substitutions électrophiles se feront en ortho et para avec un effet d'activation atténué ou même désactivation.

b) Propriétés physiques

Liquides de densité > 1 insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques.

c) Réactivité

- La substitution nucléophile directe de l'halogène (réaction d'addition, élimination) est difficile et nécessite une température élevée.

NaOH, $\Delta > 300$ °C

Cl

$\bar{O}|^{-} Na^{+}$

NH_3, $\Delta = 200$ °C, P

NH_2

Il faut noter que des groupements attracteurs placés sur le cycle en ortho et para rendent ces réactions plus aisées.

O_2N — Cl — NO_2 NaOH, $\Delta \approx 80$ °C → O_2N — $\bar{O}|^{-} Na^{+}$ — NO_2

- Par ailleurs, des bases fortes peuvent arracher le proton en β de l'halogène, provoquant le départ de ce dernier et la formation d'aryne (benzyne dans le cas du cycle benzénique) instable qui réagit avec un nucléophile (réaction d'élimination addition).

*Cl, H $NaNH_2$, – 33 °C → * NH_3 → *NH_2 + * NH_2

* carbone marqué [^{14}C]

- Formation d'organo-métalliques : voir les halogénés aliphatiques.

- Substitutions électrophiles en ortho et para du noyau avec désactivation du cycle.

X_2/AL

HNO$_3$
H$_2$SO$_4$

AL = acide de Lewis

2. Dérivés benzyliques : ArCH$_2$X

L'halogène est porté par un carbone sp^3, il n'y a plus de conjugaison avec le cycle. Par contre, le départ de l'halogène conduit à un carbocation stabilisé par résonance avec le cycle (analogie avec les dérivés allyliques). Les halogénures benzyliques seront donc plus réactifs que les halogénures aliphatiques saturés.
On observe de nombreuses réactions de substitution nucléophile ; exemples :

NaOH → C$_6$H$_5$–CH$_2$–ONa
C$_6$H$_5$–CH$_2$Cl — NH$_3$ → C$_6$H$_5$–CH$_2$–NH$_3^+$Cl$^-$
KCN → C$_6$H$_5$–CH$_2$–CN

Il y a comme précédemment formation d'organo-métalliques.

IV. Dérivés carbonylés (aldéhydes et cétones)

A. Dérivés carbonylés aliphatiques

Formule générale : R(R')C=O cétones

Les aldéhydes possèdent au moins un hydrogène lié au carbone du carbonyle, les cétones ne possèdent aucun hydrogène lié au carbonyle.

$$\begin{matrix} R \\ \quad \backslash \\ \quad C=\overline{O} \\ \quad / \\ H \end{matrix} \text{ aldéhydes}$$

Nomenclature : nom de l'hydrocarbure et suffixe *-al* pour les aldéhydes

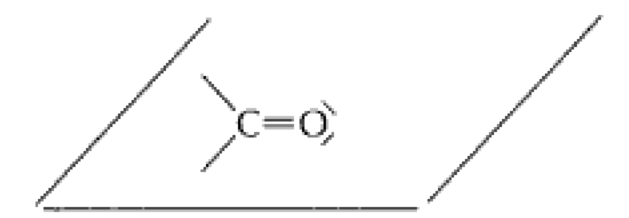
(CH_3CHO : éthanal, nom commun : acétaldéhyde),

suffixe *-one* pour les cétones

($CH_3-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-CH_3$ propanone, nom commun acétone)

1. Structure

Le carbone du carbonyle a une hybridation sp^2, structure plane.



La double liaison est polarisée (attraction des électrons par l'oxygène).

$$\begin{matrix} \backslash \\ C=\overline{O} \\ / \end{matrix}$$

δ^+ δ^-

2. Propriétés physiques

Les premiers termes sont liquides (sauf le méthanal, HCHO, qui est un gaz).

$CH_3-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-CH_3$ Eb 56,5 °C CH_3CHO Eb 20,8 °C

Les aldéhydes et cétones de bas poids moléculaire sont solubles dans l'eau et les solvants organiques.

3. Réactivité

- En raison de la polarisation de la double liaison $\overset{\delta+\ \ \delta-}{\rangle C=\overline{O}}$

  les nucléophiles peuvent attaquer le carbone ; la réaction se termine généralement par la fixation d'un proton venant du solvant sur l'oxygène.

$$\rangle C=\overline{O} \xrightarrow{Nu^-} -\underset{\underset{Nu}{|}}{\overset{|}{C}}-\overline{\underline{O}}|^- \longrightarrow -\underset{\underset{Nu}{|}}{\overset{|}{C}}-OH$$

Exemples de réaction d'addition sur le carbonyle

$>C=O$:

- 1) RMg X ; 2) H_3O^+ → $R-\overset{|}{\underset{|}{C}}-OH$ alcools I, II, III provenant respectivement du méthanal, d'un aldéhyde, d'une cétone
- 1) $R-C\equiv C-Me$; 2) H_3O^+ → $R-C\equiv C-\overset{|}{\underset{|}{C}}-OH$ alcool acétylénique
- 1) HCN/B^- ; 2) H_3O^+ → $R-\overset{OH}{\underset{|}{C}}-C\equiv N$ nitrile alcool (cyanhydrine)
- $NaHSO_3$ → $R-\overset{OH}{\underset{|}{C}}-SO_3Na$ combinaison bisulfitique

Avec les molécules azotées, l'addition est généralement suivie de l'élimination d'une molécule d'eau.

$>C=O$:

- RNH_2 → $>C=\bar{N}-R$ imines (bases de Schiff)
- H_2NOH → $>C=\bar{N}-OH$ oximes
- H_2N-NH_2 → $>C=\bar{N}-NH_2$ hydrazones
- $H_2N-NH-C_6H_5$ → $>C=\bar{N}-NH-C_6H_5$ phénylhydrazone
- $H_2N-NH-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH_2$ → $>C=\bar{N}-NH-\underset{O}{\underset{\|}{C}}-NH_2$ semicarbazone

Dans ces réactions d'addition au carbonyle, les cétones sont en général moins réactives que les aldéhydes car elles possèdent deux groupements alkyles inducteurs positifs (+ I) qui diminuent la charge positive du carbone.

En présence d'acides, c'est l'oxygène portant la charge partielle négative qui peut être attaqué par le proton, la charge positive du carbone augmente et l'attaque par le nucléophile devient plus facile.

$$>C=\ddot{O} \xrightarrow{H^+} >\overset{+}{C}-OH \xrightarrow{Nu^-} >C(OH)(Nu)$$

Exemple d'addition catalysée par les acides

$$>C=\ddot{O} \underset{H_2O/H^+}{\overset{ROH/H^+}{\rightleftharpoons}} >C(OH)(OR) \underset{H_2O/H^+}{\overset{ROH/H^+}{\rightleftharpoons}} >C(OR)(OR)$$

aldéhydes	hémi { acétals	acétals
cétones	hémi { cétals	cétals

Les composés formés sont stables en milieu alcalin, hydrolysés en milieu acide.

- L'hydratation conduit à des hydrates instables (le formol est une solution aqueuse de formaldéhyde) sauf dans le cas de l'hydrate de chloral où les chlores stabilisent l'hydrate par effet attracteur.

$$Cl_3C \leftarrow C(H)(OH)(OH)$$

- Citons aussi la réaction de Wittig conduisant aux alcènes

$$[(C_6H_5)_3P^+-CH^--R \longleftrightarrow (C_6H_5)_3\,P=CH-R + >C=\ddot{O}]$$

$$\longrightarrow R-CH=C< + (C_6H_5)_3\,PO$$

- Réactions de réduction : elles conduisent, à partir des aldéhydes, aux alcools I et, à partir des cétones, aux alcools II.
  Réducteurs employés :
  - H_2/Ni RANEY/Δ/P ;
  - CH_3 COOH/Zn ;
  - Al LiH_4 ou $NaBH_4$;
  - Na/C_2H_5OH (surtout avec les cétones qui résistent en milieu alcalin).

  On peut aussi obtenir les dérivés saturés (méthodes de Clemmensen HCl/Zn(Hg)/Δ ou de Wolf-Kischner : 1) $H_2N{-}NH_2$ 2) HO^-/Δ).
- Réactions d'oxydation : les aldéhydes sont oxydés beaucoup plus facilement que les cétones, on obtient ainsi des acides par action d'oxydants doux : réactifs de Tollens, Fehling, Benedict. Les cétones ne sont oxydées qu'en présence d'oxydants forts ($KMnO_4$ concentré chaud).

- Propriétés dues à la mobilité de l'hydrogène situé en α du carbonyle : mobilité due à l'attraction du carbonyle, cet hydrogène peut être arraché par une base, formation d'anions énolates.

$$B^- + H-\overset{|}{\underset{|}{C}}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}- \rightarrow \left[-\overset{|}{\underset{\ominus}{C}}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}- \longleftrightarrow \; >C=C<_{O^{\ominus}} \right]$$

stabilisation par résonance

C'est ainsi que, dans les réactions d'aldolisation ou de cétolisation, deux molécules carbonylées peuvent réagir entre elles (énolate de l'une sous forme carbanion, groupement carbonyle de l'autre). On obtient ainsi des β-hydroxy-aldéhydes ou cétones (aldols ou cétols).

$$R-CH_2-C(=O)-R_1 \xrightarrow{B^-} R-\overset{\ominus}{C}H-C(=O)-R_1 \quad (R_1 = H \text{ ou alkyl})$$

$$R-\overset{\ominus}{C}H-C(=O)R_1 + R-CH_2-C(=O)R_1 \xrightarrow{1)\;\; 2)\, H^+} R-CH(C(=O)R_1)-C(OH)(R_1)-CH_2-R$$

Ces aldols ou cétols peuvent subir une réaction de crotonisation (déshydratation en milieu acide ou alcalin par chauffage).

$$R_1-C(=O)-CH(R)-C(OH)(R_1)-CH_2R \xrightarrow[(-H_2O)]{H^+ \text{ ou } HO^-/\Delta} R_1-C(=O)-C(R)=C(R_1)-CH_2R$$

Citons aussi la réaction haloformique (méthyl-cétones) et la substitution par un halogénure d'alkyle :

$$R-C(=O)-CH_3 + X_2 + \underset{\text{excès}}{NaOH} \xrightarrow{\Delta} R-C(=O)-O^- Na^+ + \underset{\text{haloforme}}{X_3CH}$$

$$R-C(=O)-CH_2-R \xrightarrow[2)\, R_1X]{1)\, B^-\, Me^+} R-C(=O)-CH(R_1)-R$$

Enfin l'énolisation peut être acido-catalysée.

$$R-C(=O)-CH_3 + X_2 \xrightarrow{H_3O^+} R-C(=O)-CH_2X + HX$$

- Réaction particulière aux aldéhydes ne possédant pas d'hydrogène sur le Cα (Cannizzaro) oxydoréduction.

$$R-\overset{R}{\underset{R}{C}}-CHO \xrightarrow[\Delta \quad 2)\ H_3O^+]{1)\ KOH/C_2H_5OH} R-\overset{R}{\underset{R}{C}}-CH_2OH + R-\overset{R}{\underset{R}{C}}-COOH$$

B. Dérivés carbonylés aromatiques : $Ar-\underset{\overset{\|}{O}}{C}-$

Seuls les dérivés nucléaires (groupement carbonyle fixé sur le noyau) possèdent des propriétés particulières.

1. Structure

Le groupement $>C=O$ est plan et exerce un effet –M sur le noyau (conjugaison noyau, carbonyle).

$C_6H_5-C(=O) \longleftrightarrow$ forme quinoïde ($^+$ sur le cycle, $C-O^{\ominus}$) $\longleftrightarrow \cdots$

2. Propriétés physiques

Ce sont des liquides (premiers termes) puis des solides.

C_6H_5-CHO benzaldéhyde Eb = 179 °C F = – 26 °C

$C_6H_5-\underset{\overset{\|}{O}}{C}-Ch_3$ acétophénone Eb = 202 °C F = 20 °C

insolubles dans l'eau

3. Réactivité

- Les dérivés carbonylés aromatiques sont moins réactifs que les aliphatiques (la conjugaison avec le cycle atténuant la charge positive du carbone).
- Le noyau est désactivé, les substitutions électrophiles se feront en méta et seront assez difficiles.

$$C_6H_5-CHO \xrightarrow[H_2SO_4]{HNO_3} m\text{-}NO_2-C_6H_4-CHO$$

- On retrouve certaines propriétés des dérivés carbonylés aliphatiques telles que la réduction en alcool, les additions nucléophiles d'acide cyanhydrique, de dérivés azotés, l'oxydoréduction de Cannizzaro (aldéhydes).
- Par contre, les aldéhydes sont oxydés beaucoup plus difficilement qu'en série aliphatique.

$$C_6H_5{-}CHO \xrightarrow{KMn\,O_4} C_6H_5{-}COOH$$

- Ces dérivés carbonylés peuvent se condenser avec des méthylènes activés $-\overset{|}{\underset{\ominus}{C}}-$
Exemple :

$$C_6H_5{-}CHO + R{-}CH_2{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R_1 \xrightarrow[2)\ H^+]{1)\ B^-} C_6H_5{-}CH{=}C(R){-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R_1$$

(R_1=H ou alkyl)

- Réaction de Perkin

$$C_6H_5{-}CHO + CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}\bar{O}{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_3$$

$$\xrightarrow[\substack{2)\ \Delta \\ 3)\ H_3O^+}]{1)\ CH_3COO^-K^+} C_6H_5{-}CH{=}CH{-}COOH$$

ac. phényl cinnamique

V. Acides carboxyliques

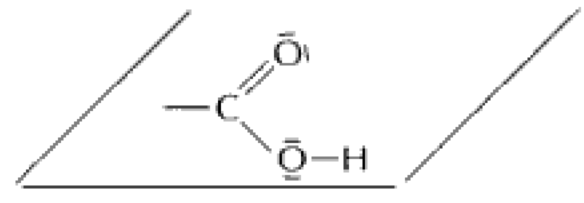
A. Acides carboxyliques aliphatiques : RCOOH

Groupement fonctionnel carboxyle COOH.
Nomenclature : le terme acide est suivi du nom de l'hydrocarbure puis du suffixe *-oïque*

$CH_3{-}CH_2{-}COOH$ acide propanoïque

1. Structure

Le carbone d'hybridation sp^2 forme une double liaison avec l'oxygène et une liaison avec l'hydroxyle.



2. Propriétés physiques

Les premiers termes sont des liquides incolores à odeur piquante. Ils présentent des points d'ébullition et de fusion supérieurs à ceux des alcools de même masse (HCOOH Eb = 101 °C, CH_3COOH Eb = 118 °C) ; en effet, il peut y avoir formation de dimères cycliques (deux liaisons hydrogène entre deux molécules d'acide).

R—C(=O)—O—H ···· O=C(—R)—O—H ···· (dimère cyclique)

Les premiers termes sont solubles dans l'eau (la solubilité diminue lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente).

3. Réactivité

- La liaison O–H est polarisée (comme celle des alcools) mais la présence du carbonyle lié au même carbone rend l'hydrogène beaucoup plus mobile : 1) le carbonyle a un effet attracteur d'électrons (–I), 2) le départ du proton engendre un anion carboxylate stabilisé par résonance.

$$R-C(=O)-O-H + H_2O \rightleftharpoons \left[R-C(=O)-O^{\ominus} \longleftrightarrow R-C(-O^{\ominus})=O \right] H_3O^+$$

- L'acidité est relativement faible et dépend des effets inducteurs des groupements substituant le carboxyle : les substituants donneurs diminuent l'acidité, les substituants attracteurs l'augmentent :

HCOOH	pKa = 3,68
$CH_3 \rightarrow COOH$	pKa = 4,74
$Cl \leftarrow CH_2 \leftarrow COOH$	pKa = 2,82

Des sels sont obtenus par action de bases :

$$RCOOH + NaOH \rightarrow RCOO^-Na^+ + H_2O$$

- Les acides sont beaucoup moins réactifs avec les nucléophiles que les aldéhydes et cétones. La charge positive du carbone du carbonyle est neutralisée par la délocalisation d'un doublet libre de l'oxygène de l'hydroxyle, la catalyse acide permet d'augmenter cette charge positive et ainsi de favoriser l'attaque nucléophile.

$$R-C(=O)-O-H \xrightarrow{H^+} \left[R-C(=O^+-H)-O-H \longleftrightarrow R-\overset{\oplus}{C}(-O-H)-O-H \right] \quad (N^-)$$

ainsi la réaction d'estérification nécessite une catalyse (acides minéraux).

$$R{-}COOH + R_1OH \xrightarrow[H^+]{} R{-}C({=}O){-}O{-}R_1 + H_2O \quad \text{Fischer}$$

- L'halogénation permet d'obtenir des halogénures d'acides beaucoup plus réactifs et pouvant subir des réactions de substitutions nucléophiles (action de l'eau, des alcools, de l'ammoniac, des amines, des organomagnésiens, etc.).

$$RCOOH \xrightarrow[\text{ou } SOCl_2]{PCl_5} R{-}C({=}O)Cl$$

- Par déshydratation entre deux molécules d'acides (par chauffage, en présence de déshydratants), on obtient des anhydrides d'acides qui eux aussi seront plus réactifs que les acides.

$$R{-}C({=}O){-}OH + HO{-}C({=}O){-}R \xrightarrow[P_2O_5]{\Delta} R{-}C({=}O){-}O{-}C({=}O){-}R$$

- Enfin, les hydrogènes situés sur le carbone α sont mobiles et donc substituables

$$R{-}CH_2{-}COOH \xrightarrow[P]{Br_2} R{-}CH(Br){-}COOH$$

- Citons enfin les réactions de décarboxylation et de réduction (plus faciles sur les chlorures que sur les acides)

$$RCOONa \xrightarrow[H_2O]{NaOH/\Delta} RH$$

$$R{-}C({=}O)Cl \xrightarrow[\text{C/Pd désactivé}]{H_2} RCHO \text{ (Rosenmund)}$$

B. Acides carboxyliques nucléaires : Ar–COOH

1. Structure

Le groupement carboxylique est plan comme celui des aliphatiques, il est coplanaire avec le noyau, ce qui entraîne une conjugaison et une attraction des électrons du noyau due à l'effet mésomère (–M) du carboxyle.

$$C_6H_5{-}C(OH){=}O \longleftrightarrow {}^{+}C_6H_5{=}C(OH){-}O^{\ominus} \longleftrightarrow$$

2. Propriétés physiques

Ce sont des solides (C_6H_5—COOH F = 122,4 °C)

peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques (ex. : éther).

3. Réactivité

En raison de l'effet –M du carboxyle, le noyau est désactivé et les substitutions électrophiles auront lieu en méta.
L'acidité dépend des groupements substituant le noyau.

C_6H_5—COOH pKa = 4,18

Cl—C_6H_4—COOH pKa = 3,98

CH_3O—C_6H_4—COOH pKa = 4,47

Les réactions d'estérification, d'halogénation, de déshydratation sont du même type qu'en série aliphatique. Par contre, la réaction de décarboxylation est plus facile (chauffage en présence d'oxyde de calcium).

VI. Amides —C(=O)—N<

Les amides sont nommés du nom de l'hydrocarbure et du suffixe *-amide*. Ils sont classés suivant le nombre d'hydrogènes substituant l'azote :

CH_3—$(CH_2)_2$—C(=O)—NH_2 : butanamide

I R—C(=O)—N(H)(H) ; II R—C(=O)—N(R_1)(H) ; III R—C(=O)—N(R_1)(R_2)

1. Structure

Le groupement amide est plan, le carbone et l'azote ont une hybridation sp^2, ce qui permet une délocalisation du doublet d'électrons de l'azote vers le carbonyle (caractère partiel de double liaison C=N).

2. Propriétés physiques

Les amides primaires et secondaires tendent à s'associer en dimères (liaisons hydrogène comme dans les acides carboxyliques mais moins fortes) ; les amides primaires sont solides sauf le formamide $HCONH_2$, F = 2,5 °C

$CH_3-C(=O)-NH_2$ éthanamide ou acétamide (F = 82,3 °C). Les points de fusion et d'ébullition diminuent par substitution de l'azote :

$$CH_3-C(=O)-N(CH_3)_2$$

N, N diméthylacétamide F = – 20 °C (plus de liaison hydrogène).
Les amides de poids moléculaire faible sont solubles dans l'eau.

3. Réactivité

- En raison de leur structure, les amides sont moins basiques que les amines, la protonation se fera surtout sur l'oxygène : en effet, premièrement l'oxygène est plus électronégatif que l'azote et, deuxièmement, la protonation de l'azote conduirait à un cation non stabilisé par résonance.

$$R-C(=O)-NH_2 + H_3O^+ \rightleftharpoons \left[R-C(=\overset{+}{O}-H)-NH_2 \longleftrightarrow R-\overset{\oplus}{C}(-O-H)-NH_2 \longleftrightarrow R-C(-O-H)=\overset{\oplus}{N}H_2 \right] + H_2O$$

  Les amides sont d'autre part acides, le départ d'un proton conduisant à un anion stabilisé par résonance.

$$R-C(=O)-NH_2 + B^- \rightleftharpoons \left[R-C(=O)-\overset{\ominus}{N}-H \longleftrightarrow R-C(-O^{\ominus})=N-H \right] + BH$$

- L'hydrolyse des amides est plus difficile que celle des esters, elle se réalise en milieu acide ou alcalin en chauffant.

$$R-C(=O)-NH_2 + H_2O \xrightarrow[\Delta]{H^+ \text{ ou } HO^-} RCOOH + NH_3$$

- La réduction se fait avec l'hydrure d'aluminium et de lithium.

$$R-C(=O)-NH_2 \xrightarrow[2)\ H_2O]{1)\ AlLiH_4} R-CH_2NH_2$$

- Les nucléophiles sont peu réactifs.
- Les amides primaires se déshydratent en nitriles à l'aide d'agents énergiques (P_2O_5, $SOCl_2$, PCl_5).

• Enfin les amides primaires subissent le réarrangement d'Hofmann :

$$R-C(=O)-NH_2 \xrightarrow{Br_2/2\ NaOH} R-NH_2 + CO_2 + 2\ NaBr + H_2O$$

VII. Thiols

Formule générale : R–SH, analogues soufrés des alcools R–OH.

1. Nomenclature

Thiol ou *mercaptan* et préfixe désignant le nombre de carbones.
Exemple : CH_3–CH_2–SH : éthane thiol ou éthyl mercaptan.

2. Préparation

Action d'un sulfure acide sur un halogénure d'alkyle :

$$H-S^-Na^+ + R-X \rightarrow R-S-H + NaX$$

Les thiophénols sont obtenus à partir des sulfochlorures correspondants :

$$C_6H_5-SO_2Cl \xrightarrow{Zn/H^+} C_6H_5-SH$$

3. Propriétés physiques

Composés à odeur désagréable, les points d'ébullition sont inférieurs à ceux des alcools correspondants et la solubilité dans l'eau est plus faible. En effet, le soufre est moins électronégatif que l'oxygène, les liaisons hydrogène entre molécules de thiols ou entre molécules de thiols et molécules d'eau seront donc moins fortes que pour les alcools.

4. Propriétés chimiques

a) Acidité

L'atome de soufre est plus gros que l'atome d'oxygène donc plus polarisable, l'acidité sera donc plus élevée :

éthane thiol pKa = 10,6 éthanol pKa = 15,9

Conséquence : arrachement d'un proton par un métal ou une base :

$$R-S-H + C_2H_5O^-Na^+ \rightarrow R-S^-Na^+ + C_2H_5OH$$

Les thiolates ou mercaptides obtenus sont solubles dans l'eau si le cation est un métal alcalin, insolubles avec les métaux lourds (Hg^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}) :

$$2R-SH + HgCl_2 \rightarrow (R-S-)_2Hg + 2HCl$$

La toxicité des métaux lourds est due à la formation de ces thiolates à partir de molécules bioorganiques (ex. : protéines) contenant des thiols libres.
Ces thiolates sont plus stables que les alcoolates correspondants.

b) Thioacétals, thiocétals

Formés avec des dérivés carbonylés en milieu acide comme les acétals et cétals (alcools).

$$RR'C{=}O + 2\,R_1SH \xrightarrow{H^+} RR'C(SR_1)_2$$

c) Oxydation

L'oxydation des thiols est différente de celle des alcools, pour ces derniers l'oxydation a lieu sur le carbone :

$$R{-}CH_2{-}OH \longrightarrow R{-}C({=}O){-}OH$$

Pour les thiols l'oxydation se produit sur le soufre.
En présence d'oxydants énergiques ($KMnO_4$, HNO_3) se forment les acides sulféniques, sulfiniques, sulfoniques :

$$R{-}SH \longrightarrow \underset{\text{sulfénique}}{R{-}S{-}OH} \longrightarrow \underset{\text{sulfinique}}{R{-}S({=}O){-}OH} \longrightarrow \underset{\text{sulfonique}}{R{-}S({=}O)_2{-}OH}$$

En présence d'oxydants doux (iode, brome) se forment les disulfures d'alkyles, réaction pouvant se produire spontanément à l'air libre.

$$C_2H_5{-}SH \xrightarrow{I_2,\ Br_2,\ O_2} C_2H_5{-}S{-}S{-}C_2H_5$$

À l'inverse, les réducteurs courants (H_2, $LiAlH_4$) convertissent les disulfures en thiols.

$$R{-}S{-}S{-}R \xrightarrow{\text{« Red »}} 2R{-}SH$$

Si thiols et disulfures sont présents en même temps, il s'établit un équilibre :

$$C_2H_5SH + C_3H_7SSC_3H_7 \rightleftharpoons C_2H_5SSC_3H_7 + C_3H_7SH$$

Ces équilibres sont importants dans le cas de molécules biologiques telles que les protéines qui contiennent des thiols libres nécessaires à leur fonctionnement :

$$\underset{\text{Cystéine}}{2Cys{-}SH} \rightleftharpoons \underset{\text{Cystine}}{Cys{-}S{-}S{-}Cys}$$

Hors du milieu cellulaire, les molécules s'oxydent spontanément en disulfures et perdent leur activité biologique ; pour rétablir celle-ci, il est possible d'ajouter un large excès de thiol.
Exemple :

$$R{-}S{-}S{-}R + 2\,HS{-}CH_2CH_2{-}OH \rightleftharpoons 2R{-}SH + HOCH_2CH_2SSCH_2CH_2OH$$

2-Mercapto éthanol
Excés

Ou ajouter du dithiothreitol (DTT ou réactif de Cleland's) en plus faible concentration, la constante d'équilibre est en faveur de la formation du disulfure cyclique (une réaction intramoléculaire donnant un cycle à 5 ou 6 sommets est favorisée par rapport à la réaction intermoléculaire).

R—S—S—R + HS—CH₂—CH(OH)—CH(OH)—CH₂—SH ⇌ 2 RSH + disulfure cyclique (S—CH₂—CH(OH)—CH(OH)—CH₂—S)

dithiothréitol

Ce principe est utilisé pour le dosage spectrophotométrique des thiols en employant des disulfures aromatiques :

RSH + réactif d'Ellman (HOOC, NO₂-phényl—S—S—phényl-NO₂, COOH) → RS—S—phényl(NO₂)(COOH) + HS—phényl(O₂N)(COOH)

réactif d'Ellman

jaune en milieu alcalin

d) Sulfures

Analogues soufrés des éthers oxydes, préparés par action des thiolates sur des halogénures d'alkyles :

$$RS^- + RX \rightarrow R{-}S{-}R$$

Le soufre peut être oxydé en donnant les sulfoxydes et les sulfones :

$$R{-}S{-}R \xrightarrow{H_2O_2} R{-}S(=O){-}R \rightarrow R{-}S(=O)_2{-}R$$

VIII. Stéréochimie

A. Représentation graphique

1. Carbone asymétrique

Un carbone est asymétrique s'il porte quatre substituants différents :

$$H_3C-CH_2-\underset{CH_3}{\overset{H}{C}}-CH_2CH_2-CH_3$$

2. Représentation graphique d'une molécule

a) Représentation perspective

La molécule est représentée sous un angle de perspective permettant de percevoir la disposition respective des groupes.

Exemple : 3-bromo pentan-2-ol (représentation d'un des quatre stéréo-isomères)

C_2H_5 OH H H Br CH_3

b) Représentation projective

La formule de la molécule est projetée sur un plan en respectant les consignes suivantes :

- partie dans le plan : trait plein —
- groupe à l'arrière du plan : flèche en tirets
- groupe à l'avant du plan : flèche pleine

c) Représentation de Newman

La molécule est examinée selon l'axe d'une liaison ; les autres groupes sont projetés sur un plan perpendiculaire à l'axe de la liaison de référence

C_2H_5 OH H H Br CH_3

projective

C_2H_5 HO H H Br CH_3

Newman

d) Représentation de Fischer

Toutes les liaisons sont représentées en traits pleins horizontaux ou verticaux.

Un trait vertical correspond à une liaison dans le plan ou à l'arrière du plan.
Un trait horizontal correspond à une liaison à l'avant du plan.
Exemple : 2-Iodo butanol (un carbone asymétrique, représentation d'un des deux énantiomères)

CH_2OH / H / C / C_2H_5 / I — CH_2OH / H — I / C_2H_5

projective — Fischer

Règles à respecter :
1) La chaîne carbonée la plus longue est placée en position verticale.
2) La molécule est bloquée dans une conformation particulière dite éclipsée si la molécule comporte plusieurs carbones asymétriques.
3) Le carbone le plus oxydé est placé en haut de la chaîne.

B. Isomères de conformation (conformères ou rotamères)

Les molécules qui ne diffèrent les unes des autres que par une rotation autour d'une liaison C–C sont des isomères de conformation.
Exemple de conformation décalée et éclipsée : 3-bromo butan-2-ol (un des quatre stéréo-isomères)

C_2H_5, H, Br — OH, H, CH_3 ; Br, H, C_2H_5 — OH, H, CH_3

C. Configuration

1. Configuration d'une molécule

La configuration d'une molécule de constitution définie décrit la disposition de ses atomes dans l'espace, sans tenir compte des dispositions qui ne se différencient que par une rotation autour d'une liaison.

CH_3 / HO, H / C_2H_5 — CH_3 / H, C_2H_5 / HO — CH_3 / HO, C_2H_5 / H

même configuration

2 configurations différentes
2 stéréo-isomères

2. Configuration absolue

a) Règles de priorité

1) Il faut en premier considérer l'atome de chaque groupe directement lié au centre d'asymétrie, le nombre prioritaire sera donné à celui qui a le poids atomique le plus élevé.
Exemple : O prioritaire sur N puis C, etc.
2) Lorsqu'il y a au moins deux groupes pour lesquels le numéro d'ordre ne peut être attribué sur la base du poids atomique de l'atome directement lié au contre d'asymétrie, il faut se référer aux atomes liés.

$$H_3C-CH_2-C-CH_3$$
1 2

3) Si l'ambiguïté subsiste au deuxième ordre, il faut poursuivre l'étude au troisième ordre.
4) Les atomes à liaisons multiples sont saturés en doublant les atomes des deux extrémités de la liaison.

—CHO devient —C(H)(O)—O—C

4

H H
2 HC(=O)—C—C—OH 3
CH H
O O
CH3 CH3
1

5) Lorsqu'un substituant est chiral, on choisit la séquence R supérieure à S.

b) Configuration absolue R et S

1) Le centre d'asymétrie est examiné du côté opposé au plus petit substituant, les trois substituants visibles sont numérotés suivant les règles de priorité et la séquence de rotation (du plus gros au plus petit substituant) est examinée.

2) Si la séquence tourne à l'inverse du sens des aiguilles d'une montre, l'atome de carbone est désigné par la lettre S.
Exemple : acide lactique

COOH — H_3C — H — HO 2 COOH — H_3C (3) — OH (1)

3) Si l'observateur voit la séquence tourner dans le sens des aiguilles d'une montre, l'atome de carbone est désigné par la lettre R.

COOH — HO — H — H_3C 2 COOH — HO (1) — CH_3 (3)

D. Énantiomérie

Lorsqu'un objet et son image dans un miroir plan ne sont pas superposables, il existe une relation d'énantiomérie entre eux, et deux stéréo-isomères qui présentent cette relation sont appelés énantiomères.
Exemple : 2-amino butane

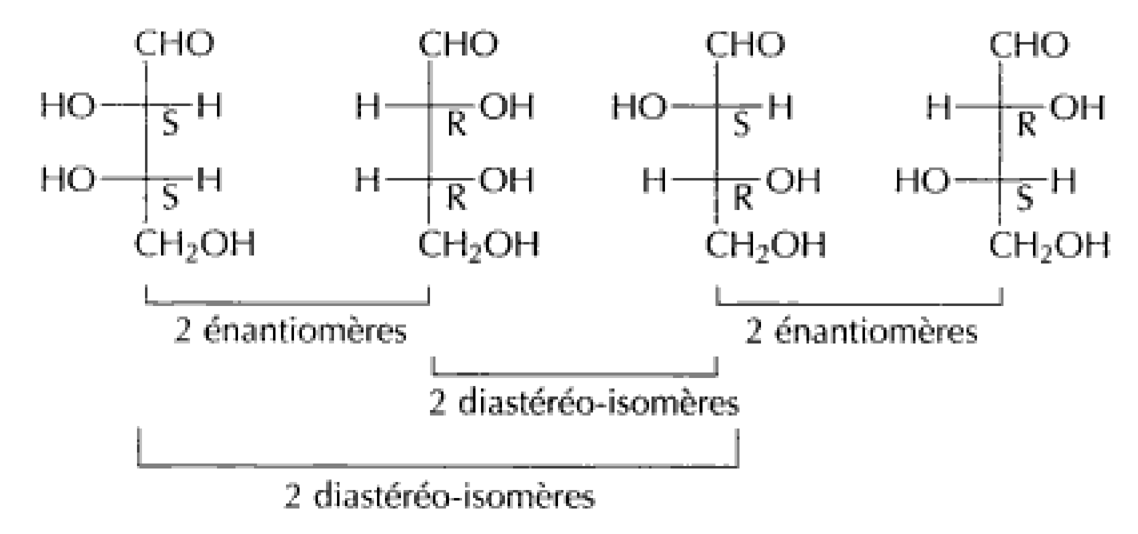
S: CH_3 — H — C_2H_5 — NH_2 | R: CH_3 — C_2H_5 — H — H_2N

La non-identité entre un objet et son image est appelée chiralité.
Les énantiomères présentent une activité optique, l'un des deux énantiomères (ou inverse optique ou encore antipode optique) dévie la lumière polarisée vers la droite (dextrogyre ou +), l'autre vers la gauche (lévogyre ou –). Le mélange à parties égales des deux énantiomères est appelé *racémique* et est inactif sur la lumière polarisée.

E. Diastéréo-isomérie

La *diastéréo-isomérie* se manifeste chez les composés qui possèdent plus d'un centre chiral. Ce sont des composés de même formule développée, qui présentent une activité optique et qui cependant ne sont pas des énantiomères. Ils présentent la même orientation de leurs substituants autour d'un ou plusieurs centres d'asymétrie et une orientation différente autour d'un ou plusieurs centres d'asymétrie. Pour les énantiomères, la disposition est différente autour de tous les centres d'asymétrie.

Exemple : aldotétroses



Attention ! la nomenclature D et L n'a aucun rapport avec l'activité optique (nom de série d'oses ou d'amino-acides).

F. Isomérie Z/E et cis/trans

Dans le cas des éthyléniques, il existe une liaison Π entre les carbones de la double liaison, liaison Π perpendiculaire au plan de la molécule et empêchant la rotation entre les deux carbones, les substituants sont donc fixés de part et d'autre du plan contenant la liaison Π. Sur chaque carbone il faut déterminer le groupement prioritaire. Si les deux groupements prioritaires sont de part et d'autre du plan, la configuration sera appelée E, si les deux groupements sont du même coté du plan, la configuration sera appelée Z.
Exemple : 4-méthyl hept-3-éne

$CH_3-CH_2-CH_2(CH_3)C=CH(CH_2-CH_3)$: E

$CH_3-CH_2-CH_2(CH_3)C=C(CH_2-CH_3)H$: Z

Dans le cas où il existe un hydrogène sur chacun des carbones éthyléniques, il peut être défini une isomérie cis/trans.
Si les hydrogènes sont du même coté du plan : isomère cis.
Si les hydrogènes sont de part et d'autre du plan : isomère trans.
Exemple : acide but-2-énoïque

$CH_3(H)C=C(H)COOH$: *trans* E

$CH_3(H)C=C(COOH)H$: *cis* Z

Ces termes *cis* et *trans* sont aussi utilisés pour les cyclanes.

Exemple : 1,2-diméthyl cyclo pentane

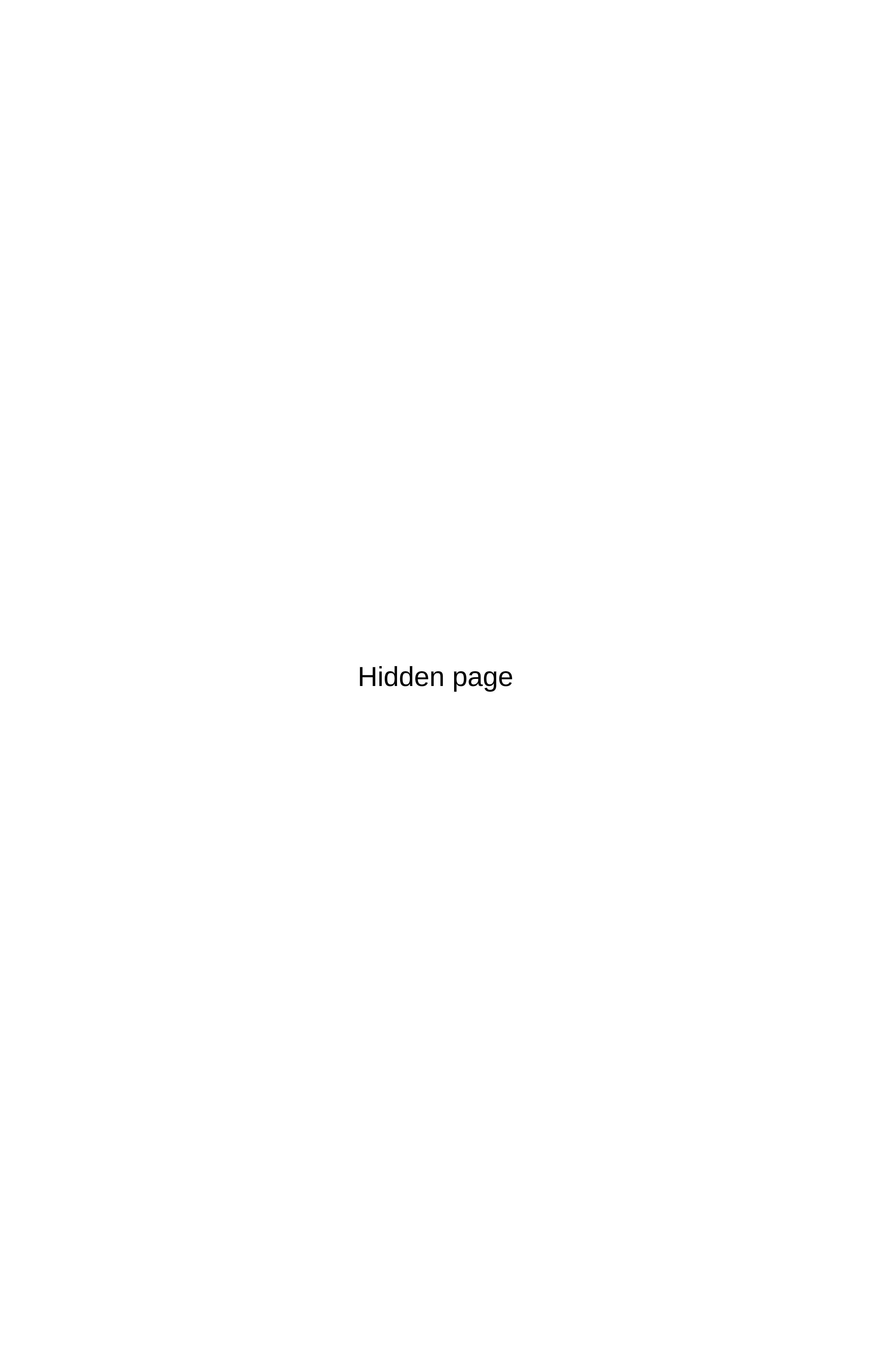
CH_3 H H CH_3 — *trans*

H H CH_3 CH_3 — *cis*

LA LISTE DES RÉACTIONS CITÉES N'EST PAS EXHAUSTIVE, SEULS QUELQUES EXEMPLES ILLUSTRENT LA RÉACTIVITÉ DES FONCTIONS DÉCRITES.

Pour en savoir plus

- Gallon H. *Chimie organique*. Masson, 2003.
- Hart H., Conia J.-M. *Introduction à la chimie organique*. Dunod, 1997.
- Loudon G.M. *Organic Chemistry*. Addison-Wesley, 2002.
- Morrison R.T., Boyd R.N. *Organic Chemistry*. Boston, Allyn & Bacon, 1981.


Hidden page

Les ions en solution

J.-L. BURGOT, Laboratoire de chimie analytique, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Rennes.

L'étude des ions en solution, et plus particulièrement en solution aqueuse, a fait l'objet d'un nombre d'écrits considérable. Mais il faut dire que l'enjeu était et reste d'importance car, pour reprendre une classification usuelle, les ions participent aux phénomènes acide-base, redox, de complexation et souvent de précipitation. Pas moins ! Il faut dire aussi que les processus ioniques en solution se modélisent bien d'un point de vue mathématique à partir des connaissances thermodynamiques et cinétiques que nous en avons. Cela nous permet d'affirmer ici que le judicieux équilibre régnant entre les aspects théoriques et expérimentaux est certainement la caractéristique marquante de la chimie des solutions.

La notion de constante d'équilibre, qui régit notamment les équilibres généraux évoqués ci-dessus, est indissociable de la notion d'activité d'une espèce. Par exemple, le pH d'une solution, concept scientifique devenu une notion grand public, est défini en termes d'activité. Il en est de même pour d'autres grandeurs envisagées dans cet exposé.

C'est la raison pour laquelle **dans la première partie** *consacrée à des généralités sur les ions en solutions, nous procéderons à des rappels de thermodynamique et concernant la « structure » des solutions aqueuses.*

La deuxième partie *sera consacrée aux équilibres acide-base. Nous nous attacherons surtout à donner les définitions du pK_a et du pH, leurs significations physiques et le domaine d'utilisation de ces concepts. La définition opérationnelle du pH nécessitant l'utilisation de solutions tampon, nous serons amenés à rappeler quelques-unes de leurs propriétés. Par contre, nous ne nous attarderons pas sur la détermination expérimentale de ces paramètres, qui fait partie d'un autre exposé.*

La troisième partie *sera dévolue aux réactions de formation des complexes. Après quelques considérations générales sur les complexes et quelques rappels de terminologie, nous étudierons successivement :*

- *la stabilité des complexes en introduisant la définition des constantes thermodynamiques de stabilité ;*
- *les facteurs influençant la formation des complexes avec l'introduction des constantes conditionnelles de stabilité ;*
- *quelques aspects cinétiques concernant les réactions de complexation ;*
- *les chélates ;*
- *les composés éther-couronne et les agents cryptands.*

L'étude portera uniquement sur les solutions aqueuses car l'eau est un solvant d'une grande importance économique en raison de sa grande abondance. De plus, elle est dénuée de toxicité. D'ailleurs, ceci expliquant cela, c'est pour elle que l'état des connaissances scientifiques est le plus avancé.

Dans cet exposé, nous considérons que le lecteur a déjà assimilé les enseignements de chimie analytique de premier et deuxième cycles de l'enseignement pharmaceutique. C'est la raison pour laquelle certains points supposés connus ne sont délibérément pas rappelés.

I. Généralités : les ions en solution

A. Composition d'une solution

Pour chiffrer la composition d'une solution, c'est-à-dire pour chiffrer les proportions relatives du solvant et du soluté, plusieurs mesures de la composition sont utilisées :

- *la molarité* : c'est le nombre de moles du soluté par dm^3 de solution (symbole : c – unité : $mol.dm^{-3}$). Il s'agit d'une concentration car elle chiffre un nombre de moles de soluté par unité de volume. C'est l'unité la plus utilisée en chimie analytique pour des raisons pratiques (utilisation de la verrerie de précision) ;
- *la molalité* : c'est le nombre de moles de soluté par kilogramme de solvant (symbole : m ; unité : $mol.kg^{-1}$). C'est l'unité la plus utilisée par les physicochimistes. Son intérêt par rapport à la molarité est qu'elle est indépendante de la température ;
- *la fraction molaire* : c'est le rapport du nombre de moles d'un constituant et du nombre total de moles de tous les constituants de la solution (y compris le solvant) (symbole : x ; sans unité) ;
- pour mémoire, rappelons la *normalité* qui indique le nombre de moles de l'entité active par dm^3 de solution.

Le passage des molarités aux molalités et aux fractions molaires est régi par des formules de conversion. Celles-ci font intervenir la densité de la solution dès qu'il s'agit de molarités. Elles montrent qu'en toute rigueur molarités, molalités et fractions molaires ne sont pas mutuellement proportionnelles sauf en solutions diluées (pour lesquelles la densité de la solution est prise égale à celle du solvant). Elles montrent aussi que, pour des solutions aqueuses diluées, on peut confondre molalités et molarités. À titre d'exemple, une solution aqueuse de chlorure de sodium 1 molale est 0,98 molaire. Les deux valeurs sont encore très voisines bien que la solution ne soit pas, au sens usuel, considérée comme diluée.

B. Rappels de thermodynamique chimique

1) Rappelons que le *potentiel chimique* μ_i de toute substance s'exprime en fonction de son *activité* a_i par la relation :

$$\mu_i = \mu_i^o + RT\ln a_i \qquad (1)$$

μ_i^o est le *potentiel chimique dans l'état standard* de la substance (en abrégé : potentiel chimique standard). C'est une *constante* caractéristique de la substance à une température donnée. R est la constante des gaz parfaits. T est la température absolue de la substance.

2) Le potentiel chimique μ_i est l'enthalpie libre molaire partielle $\overline{G}_i$ de l'espèce i :

$$\mu_i = \overline{G}_i$$

Il n'est pas possible de s'attarder sur la signification physique profonde de l'enthalpie libre molaire partielle d'un soluté. Disons simplement que G.N. Lewis l'a qua-

lifiée d'« escaping tendancy » : tendance d'une substance à quitter une solution au cours d'un processus physicochimique.
Pour une solution contenant i constituants (dont le solvant), on démontre que l'enthalpie libre G de l'ensemble de la solution est donnée par la relation :

$$G = n_1\overline{G}_1 + n_2\overline{G}_2 + \ldots + n_i\overline{G}_i$$

où $n_1, n_2, \ldots, n_i$ sont les nombres de moles des différents constituants. Les enthalpies libres molaires partielles sont définies par les expressions :

$$\overline{G}_i = (\partial G/\partial n_i)_{T,\,P,\,n_j(i \neq j)}$$

Il s'agit donc de la variation de l'enthalpie libre de l'ensemble de la solution lorsque l'on fait varier d'une quantité infime le nombre de moles du constituant i à température, pression et concentrations des autres espèces j constantes. Les grandeurs molaires partielles tiennent compte de la variation fréquente des grandeurs molaires avec la composition chimique des systèmes [1].
Dans certains cas, les grandeurs molaires partielles sont indépendantes de la composition du mélange et sont égales à la grandeur molaire du composant pur. Les grandeurs molaires partielles jouent donc le rôle de grandeurs molaires mais usuellement, contrairement à ces dernières, elles ont leurs valeurs qui varient avec la composition du système. Certaines grandeurs molaires partielles sont accessibles expérimentalement (volumes par ex.), d'autres ne le sont pas (enthalpies, entropies, potentiels chimiques par exemple – ci-après).
3) Soit la réaction

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD \qquad (2)$$

La variation d'enthalpie libre ΔG accompagnant la conversion des réactifs A et B aux activités a_A et a_B en produits C et D aux activités a_C et a_D, à pression et température constantes, est donnée par la relation :

$$\Delta G = c\mu_C + d\mu_D - a\mu_A - b\mu_B \qquad (3)$$

En remplaçant les μ_i par leurs expressions (1) :

$$\Delta G = c\mu_C^o + d\mu_D^o - a\mu_A^o - b\mu_B^o + RT\ln\frac{a_C^c a_D^d}{a_A^a a_B^b}$$

ou en posant :

$$\Delta G^o = c\mu_C^o + d\mu_D^o - a\mu_A^o - b\mu_B^o \qquad (4)$$

1. Un exemple familier est le volume des mélanges éthanol-eau en proportions variables. Le volume total V de la solution est donné par la relation :

$$V = n_{eau}\overline{V}_{eau} + n_{eth}\overline{V}_{eth}$$

où $\overline{V}_{eau}$ et $\overline{V}_{eth}$ sont les volumes molaires partiels des deux constituants définis par :

$$\overline{V}_{eau} = (\partial V/\partial n_{eau})_{T,\,P,\,n_{eth}} \text{ et } \overline{V}_{eth} = (\partial V/\partial n_{eth})_{T,\,P,\,n_{eau}}$$

$\overline{V}_{eau}$ et $\overline{V}_{eth}$ diffèrent d'une composition du mélange à une autre.

ΔG° est une constante caractéristique de la réaction (2) à la température T. C'est *l'enthalpie libre standard* de la réaction (2). La relation (4) est fondamentale.

4) Les valeurs absolues des potentiels chimiques μ_i et μ_i° ne sont pas accessibles expérimentalement. Seules le sont les variations d'enthalpie libre ΔG et ΔG° [2].

5) La variation d'enthalpie libre accompagnant un processus à pression et à volume constants est égale au travail maximal (autre que le travail mécanique) changé de signe que le processus peut fournir à l'extérieur. Le travail maximal est obtenu dans les conditions de réversibilité (ci-après).

6) Si pour un processus envisagé évoluant à pression et température constantes, on a :

$\Delta G < O$:le processus est spontané et le travail est effectivement récupérable.

$\Delta G > O$:le processus n'est pas spontané. Il faut lui fournir du travail pour qu'il ait lieu.

Dans le paragraphe précédent, les notions de travail fourni ou récupérable doivent donc être prises au sens algébrique. Enfin, si :

$\Delta G = O$:le système est à l'équilibre.

Dans ce cas, l'équation (4) donne :

$$\Delta G^\circ = -RT\ln\frac{a_{Ceq}^{c}a_{Deq}^{d}}{a_{Aeq}^{a}a_{Beq}^{b}}$$

Puisque ΔG° est une constante pour une température donnée, on en déduit que

$$\frac{a_{Ceq}^{c}a_{Deq}^{d}}{a_{Aeq}^{a}a_{Beq}^{b}} = K_{eq} \qquad (5)$$

Naturellement, seules les valeurs des activités prises à l'équilibre obéissent à cette relation, d'où le symbolisme.

Ainsi se trouve démontrée, par des considérations thermodynamiques, la loi d'action de masse. Un point important à souligner est que la valeur Keq ne dépend pas que de la température. Elle dépend aussi des états standards des espèces A, B, C et D (cf. ci-après).

7) La définition des activités a_i et la justification de l'expression (1) résultent de l'adaptation des relations thermodynamiques décrivant le comportement des gaz parfaits, des gaz réels et de leurs mélanges aux solutions idéales et aux solutions réelles.

Le point essentiel est que pour *les solutions idéales*, le potentiel chimique de chacun des composants (y compris le solvant) est relié à sa concentration exprimée en fractions molaires par la relation :

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT\ln x_i \qquad (6)$$

2. Il ne faut pas se méprendre. Ceci n'est pas une impossibilité d'ordre expérimental qui pourrait être surmontée ultérieurement, par exemple par l'avènement d'un nouvel appareillage. C'est une impossibilité essentielle et même originelle car les fonctions enthalpie, enthalpie libre et entropie ne sont définies qu'en termes de leurs variations. Cette démarche est d'ailleurs courante. Par exemple, on sait déterminer sans ambiguïté la différence d'altitude entre deux points, mais l'altitude absolue d'un point n'a pas de signification. Seule est accessible l'altitude par rapport à un autre point choisi comme référence.

arbitraires. Adopter une valeur plutôt qu'une autre revient à changer l'état standard. Pour des raisons pratiques, d'une façon quasi systématique mais nullement obligatoire, les états standard sont choisis de telle sorte que pour les *solutions diluées* :

- les valeurs des activités des *solutés* tendent vers la valeur numérique de leurs compositions exprimées en molalités ou en molarités soit :

$$a_{i_m} \to \frac{m_i}{m_i^\circ}$$

$$a_{i_m} \to \frac{m_i}{1} \quad \text{soit } a_i \to m_i \quad \text{(valeur numérique) lorsque } m_i \to 0$$

ou :

$$a_{i_c} \to \frac{c_i}{c_i^\circ}$$

$$a_{i_c} \to \frac{c_i}{1} \quad \text{soit } a_i \to c_i \quad \text{(valeur numérique) lorsque } c_i \to 0$$

- la valeur de l'activité du *solvant* tende vers la valeur numérique de sa concentration exprimée en fraction molaire :

$$a_{solu} \to x_{solu} \qquad x_{solu} \to 1$$

D'une façon générale on définit les coefficients d'activité f_i, γ_i et y_i qui sont des nombres sans dimension par les relations :

$$f_i = \frac{a_{i_x}}{x_i} \qquad \gamma_i = \frac{a_{i_m}}{m_i/m_i^\circ} \qquad y_i = \frac{a_{i_c}}{c_i/c_i^\circ}$$

Pour les solutions idéales f_i, γ_i et y_i sont égaux à 1 quel que soit le constituant. Il en est de même, d'après ce qui précède, pour les solutions très diluées. Pour les solutions réelles f_i, γ_i et y_i varient avec la valeur de la concentration.
L'introduction des coefficients d'activité permet d'exprimer la constante d'équilibre thermodynamique en fonction des concentrations. Dans le cas, par exemple, d'un équilibre entre solutés dont les concentrations sont exprimées en molarités, on peut écrire d'après (5) puisque $a_{i_c} = y_i c_i$.

$$Keq = \frac{[a_{Ceq}]^c[a_{Deq}]^d}{[a_{Aeq}]^a[a_{Beq}]^b} \qquad [\ ]\text{ : concentrations}$$

$$Keq = K_c\frac{y_C^c y_D^d}{y_A^a y_B^b}$$

avec :

$$K_c = \frac{[C_{Ceq}]^c[C_{Deq}]^d}{[C_{Aeq}]^a[C_{Beq}]^b}$$

K_c est la constante d'équilibre relative aux concentrations.
8) En ce qui concerne le comportement *idéal* des solutions (dont plusieurs définitions sont possibles), on admet qu'il prend son origine dans le fait qu'il n'y a *aucune interaction entre les molécules de soluté* [4]. Ces interactions peuvent être de différentes origines, par exemple d'origine électrostatique lorsque le soluté est un dipole. Il y a

4. Bates nomme les interactions entre molécules de solutés : effets de sel ou effets de concentration.

où r est la distance entre les deux charges. Cela signifie que dans l'eau la force d'attraction entre deux charges opposées est beaucoup plus faible que dans d'autres solvants comme par exemple l'acide acétique ($\varepsilon_r = 6{,}2$), le chloroforme ($\varepsilon_r = 4{,}8$), le benzène ($\varepsilon_r = 2{,}3$) à 25 °C.
Le caractère dipolaire de l'eau et sa forte constante diélectrique conditionnent considérablement l'état des espèces en solution aqueuse. *Une troisième propriété, son pouvoir donneur et accepteur de protons est également importante.* Elle sera envisagée à propos des phénomènes acide-base (cf. ci-après, la théorie de Bronsted-Lowry).

2. Les ions sont solvatés par l'eau

Les ions en solution aqueuse ne sont pas nus. Ils sont entourés par un certain nombre de molécules d'eau liées par interaction électrostatique ion – dipole (de l'eau), disposées dans une couche de solvatation primaire entourant immédiatement l'ion puis dans une couche de solvatation diffuse. On admet que le nombre de molécules d'eau dans la couche de solvatation primaire est égal au nombre de coordination de l'ion. Une théorie dynamique de la solvatation qui tient compte des échanges incessants entre les molécules d'eau solvatées et celles du « corps » du solvant au cours du déplacement de l'ion fait intervenir la notion de nombre d'hydratation de l'ion. Les interactions ion-dipole sont l'origine énergétique de la solvatation des ions. Mais il ne faut pas perdre de vue que lors de la dissolution, entrent aussi en jeu les facteurs entropiques. Ainsi, par exemple, lors de la dissolution du chlorure de sodium dans l'eau :

$$Na^+Cl^- \text{ (solide)} \rightarrow Na^+ \text{ (aq)} + Cl^- \text{ (aq)}$$

l'enthalpie de dissolution est défavorable puisque légèrement endothermique ($\Delta H_{diss} = 3{,}86$ kJ·mol^{-1} à 298 K) malgré la solvatation des ions Na^+ et Cl^- par effets électrostatiques. Mais puisque l'entropie de dissolution est favorable ($\Delta S_{diss} = 42$ J·K^{-1}·mol^{-1} à 298 K) le processus de dissolution est spontané ($\Delta G_{diss} = -8{,}4$ kJ·mol^{-1} à 298 K). Le facteur entropique est souvent décisif dans les phénomènes de solvatation (cf. : effet chélate).

3. Cas des ions métalliques

On admet à l'heure actuelle que de nombreux ions métalliques, en particulier ceux dérivés des métaux de transition donnent en solution aqueuse de véritables liaisons avec la molécule d'eau. On en possède de nombreuses preuves comme, par exemple, celle de l'existence de l'ion $Al(H_2O)_6^{3+}$ dans certains cristaux basée sur des mesures de diffraction de rayons X. Ces ions métalliques donnent de véritables complexes avec l'eau plutôt qu'une solvatation par interaction ion – dipole, au sens donné ci-dessus. Ce sont les *complexes aqua*. Les enthalpies d'hydratation élevées des ions métalliques corroborent ces résultats.

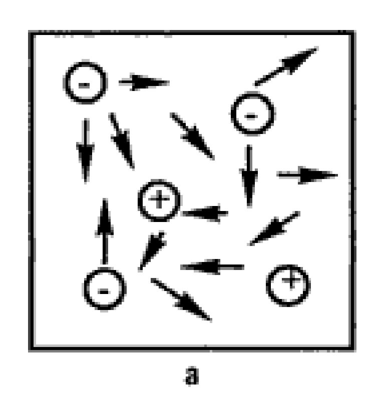
4. Les ions sont entourés par un nuage d'ions de charge opposée

En plus des interactions ion – solvant existent aussi les interactions soluté – soluté. La théorie de Debye et Hückel modélise remarquablement bien ces interactions, tout au moins dans certaines zones de concentrations de solutés (précisées plus loin). Cette théorie est bâtie sur l'hypothèse que les interactions ion – ion sont pure-

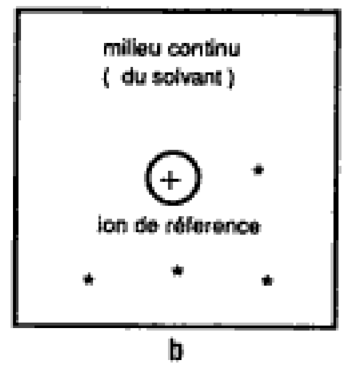
ment « coulombiennes ». Le modèle est celui d'un ion central, entouré d'un nuage diffus d'ions de charge opposée, le tout baignant dans un milieu continu de constante électrique égale à celle du solvant (*fig. 2b*). Une des conclusions de cette étude est que l'effet du nuage ionique est équivalent à celui d'un ion de charge égale et opposée à celle de l'ion central, placée à la distance x^{-1} de cet ion. Le paramètre x^{-1} appelé épaisseur effective de l'atmosphère ionique (ou longueur réciproque de Debye et Hückel) fait intervenir dans sa définition le paramètre I, appelé force ionique de la solution, défini par l'expression :

$$I_m = \frac{1}{2}\sum m_i z_i^2 \qquad \text{ou} \qquad I_c = \frac{1}{2}\sum c_i z_i^2$$

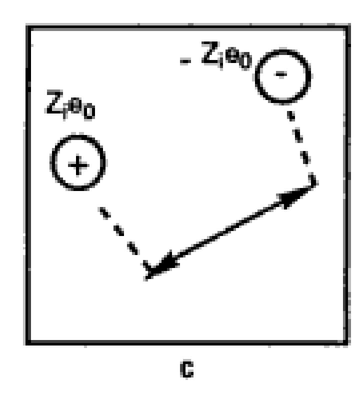
z_i charge de l'ion – m_i et c_i composition de la solution.
(Ce paramètre avait été introduit empiriquement quelques années auparavant par Lewis pour décrire certaines propriétés des solutions ioniques.) La théorie de Debye et Hückel présente plusieurs versions selon que l'ion central est supposé posséder un rayon nul ou fini. Elle a, de plus, subi des extensions. Outre l'avance théorique remarquable qu'elle a présentée, elle possède un intérêt pratique considérable car elle permet une approche par le calcul des coefficients d'activité individuels des ions. Les formules déduites de ces modèles sont données ci-après (activités et coefficients d'activité des ions).



a



b



c

Figure 2.
2a : Structure réelle de la solution électrolytique (→ molécules d'eau).
2b : Hypothèse de départ de Debye et Hückel * excès de densité de charge.
2c : Modèle équivalent de Debye et Hückel.

5. Sur la formation de paires d'ions dans l'eau

Dans l'étude de Debye et Hückel, il n'est pas envisagé la possibilité qu'un ion négatif du nuage électronique entourant l'ion positif central (ou réciproquement) s'approche (au cours de son mouvement quasi aléatoire au sein de la solution) suffisamment de celui-ci de telle sorte que la force d'attraction de Coulomb entre les deux ions devienne supérieure à l'énergie thermique de translation des deux ions. Plus brièvement, il n'est pas envisagé la formation de *paires d'ions*.
D'une façon générale, la formation d'une paire d'ions est chiffrée par une constante d'association selon le schéma :

$$A^+ + B^- \rightleftharpoons A^+B^-$$

avec : $$K_{ass} = \frac{a_{(A^+B^-)}}{a_{A^+} \cdot a_{B^-}}$$

Les théories de Bjerrum d'une part, de Fuoss d'autre part, montrent que la formation de paires d'ions est favorisée :

- *par des milieux de faible permittivité relative.* C'est la raison pour laquelle pour de nombreux solvants organiques de faible ε_r, on ne peut pas envisager d'ions libres mais quasi uniquement des paires d'ions. Si l'on prend l'exemple d'une solution de chlorure de potassium 0,1 mol.dm^{-3} dans l'acide acétique (ε_r = 6,2) on trouve 99 % de ce sel sous forme de paires d'ions ($\log K_{ass}$ = 6,9). *A contrario*, avec sa constante diélectrique élevée, l'eau n'est pas un solvant favorable à la formation de paires d'ions. La formation de paires d'ions suit la loi de dilution d'Ostwald. Plus la concentration totale en électrolyte est faible, moins il y a formation de paires d'ions.

En bref, on peut considérer qu'en solution aqueuse la formation de paires d'ions est négligeable pour les électrolytes 1,1 jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1 mol.dm$^{3.}$ Pour les électrolytes 2,2, la formation de paires d'ions ne peut totalement être négligée même pour des concentrations assez faibles de l'ordre de 0,2 mol.dm^{-3} (par exemple : $ZnSO_4 K_{ass}$ = 240).

Les paires d'ions n'interviennent pas dans la conductivité de la solution ni dans la force ionique. Elles interviennent indirectement dans la théorie de Debye et Hückel en diminuant la concentration en ions pouvant participer au nuage électronique. Dans les solvants de très très faible ε_r (benzène par exemple), des triplets et des agrégats d'ions peuvent aussi se former.

Pour la formation de paires d'ions, interviennent non seulement les facteurs énergétiques évoqués ci-dessus avec la force d'attraction de Coulomb, mais aussi des facteurs entropiques.

D. Activités et coefficients d'activité des ions

Comme pour les solutés non ioniques, on exprime le potentiel chimique des ions en fonction de leurs activités. Du fait des interactions électrostatiques à longue distance entre ions en solution, les valeurs des activités s'écartent de celles des concentrations pour des concentrations (forces ioniques) plus faibles que dans le cas des solutés non ioniques. Avant de préciser ce point, il convient de souligner un point important.

1. Impossibilité d'atteindre expérimentalement l'activité d'un ion

La raison est simple. Il est impossible de préparer une solution où il n'existe seulement que des ions positifs (ou négatifs). Une solution est obligatoirement électriquement neutre. La contribution à l'enthalpie libre de la solution due à l'ion positif ne peut être dissociée de celle de l'ion négatif. Par contre, l'activité et le coefficient d'activité de *l'ensemble* de l'électrolyte peuvent être mesurés. Considérons un électrolyte univalement M A. On définit les potentiels chimiques suivants [6] :

$$\mu_{M^+} = \mu^\circ_{M^+} + RT\ln c_{M^+} + RT\ln y_{M^+}$$

$$\mu_{A^-} = \mu^\circ_{A^-} + RT\ln c_{A^-} + RT\ln y_{A^-}$$

6. Des relations analogues à celles de ce paragraphe basées sur les autres échelles de composition peuvent être écrites.

Les activités a_{M^+} et a_{A^-} ainsi que les coefficients d'activité y_{M^+} et y_{A^-} ne sont pas accessibles expérimentalement.
On définit un coefficient ionique moyen $y^{\pm}$ par la relation :

$$y^{\pm} = (y_{M^+} + y_{A^-})^{1/2}$$

D'un point de vue général, pour un électrolyte donnant γ^+ ions de valence positive z^+ et γ^- ions de valence négative z^-, le coefficient d'activité moyen est défini par :

$$y^{\pm} = [(y^+)^{\nu^+}(y^-)^{\nu^-}]^{1/\nu}$$

avec : $$\nu = \nu^+ + \nu^-$$

L'activité de l'ensemble de l'électrolyte est accessible expérimentalement et donc, ainsi, le coefficient d'activité moyen.

2. Loi limite de Debye et Hückel

L'intérêt de la théorie de Debye et Hückel est qu'elle permet de calculer les coefficients d'activité ioniques moyens mais aussi d'approcher par le calcul les coefficients d'activité individuels et ainsi les activités ioniques individuelles.
La loi limite de Debye et Hückel, fondée sur l'hypothèse que les ions sont considérés comme des points chargés (de rayon nul), relie le coefficient d'activité moyen d'un électrolyte binaire donnant des ions de charges z^+ et z^- à la force ionique par la relation

$$-\log y^{\pm} = A(z^+z^-)\sqrt{I_c}$$

La constante A dépend de la température absolue et de la constante diélectrique du solvant. Pour l'eau à 25 °C, on trouve :

$$A = 0{,}509 \qquad (I_c \text{ exprimée en mol.dm}^{-3})$$

Cette loi permet de calculer également le coefficient d'activité d'un ion individuel soit :

$$-\log y = Az^2\sqrt{I_c} \qquad (9)$$

où z est la charge de l'ion.
Cette relation ne peut bien sûr être confrontée directement à l'expérience. Par contre, le coefficient d'activité moyen peut être calculé à partir des coefficients individuels, eux-mêmes calculés par la relation (9). L'excellent accord trouvé entre les $y^{\pm}$ calculés et expérimentaux tant que la force ionique reste inférieure à 10^{-3} mol.dm^{-3} est le grand triomphe de la théorie de Debye et Hückel. Il est à noter que la loi limite ne fait aucune distinction entre les ions pourvu qu'ils aient la même électrovalence. Ceci constitue l'hypothèse de Mac-Iness qui dit que dans une solution diluée d'un électrolyte univalent, les coefficients d'activité sont égaux

$$y_{K^+} = y_{Cl^-} = y_{KCl}$$

3. Loi de Debye et Hückel

Une modification de la loi limite, appelée parfois simplement loi de Debye et Hückel, permet de calculer les coefficients d'activité dans le domaine de forces

Une base B est une substance capable de capter un proton. C'est un accepteur de protons selon l'équilibre :

$$B + H^+ \rightleftharpoons BH^+ \qquad (12)$$

Dans l'équation (11) HA est un acide mais A^- est une base. Il suffit pour s'en rendre compte de lire la réaction de la droite vers la gauche. De même dans l'équation (12), B est la base et BH^+ l'acide. L'acide et la base liés par l'équation :

$$\text{acide} \rightleftharpoons \text{base} + H^+$$

sont appelés *acide et base conjugués*.
Notons :
- qu'en s'ionisant un acide perd une charge positive ;
- que la charge d'une espèce n'est pas liée à son caractère acide ou basique. Ainsi, par exemple, l'ion ammonium NH_4^+, l'acide acétique CH_3COOH, l'ion hydrogénosulfure SH^- sont des acides ;
- que certaines espèces sont à la fois accepteur et donneur de protons. Ce sont des composés *ampholytes* ou *amphotères*. C'est le cas de l'eau qui se comporte comme un acide :

$$H_2O \rightleftharpoons OH^- + H^+ \qquad (13)$$

et aussi comme une base :

$$H_2O + H^+ \rightleftharpoons H_3O^+ \qquad (14)$$

L'ion H_3O^+ est le cation *oxonium*. Cet exemple est intéressant car l'on constate qu'avec la théorie d'Arrhenius l'équilibre (13) suffit pour expliquer le caractère amphotère de l'eau, alors que la théorie de Bronsted nécessite les deux équations (13) et (14) ;
- qu'en toute rigueur des hydroxydes métalliques comme l'hydroxyde de sodium ne sont pas des bases de Bronsted car l'acide conjugué n'existe pas. Par contre, ce sont des bases d'Arrhenius[8].

La définition de Bronsted-Lowry est très générale car il n'y est pas fait mention du solvant.

b) Inexistence du proton en solution

Eu égard au fait que le proton est une particule élémentaire de charge positive de très faible rayon (10^{-13} cm : ordre de grandeur pour les autres ions $\approx 10^{-8}$ cm) il règne à sa surface un champ électrique intense qui lui confère la possibilité de se fixer sur toute espèce possédant une charge négative. Ainsi dans l'eau, il y a fixation du proton sur la molécule d'eau pour donner le cation oxonium :

$$H^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+$$

Selon Kolthoff, la constante de cet équilibre serait de l'ordre de 10^{+130} ! L'ion oxonium est lui-même lié à d'autres molécules d'eau par liaisons hydrogène. On

8. Il n'est nullement question de contester ici le caractère basique de la solution obtenue par dissolution d'hydroxyde de sodium dans l'eau. La basicité est due à la présence de l'ion OH^- qui est une base de Bronsted.

considère, à l'heure actuelle, que l'ion oxonium est associé vraisemblablement à trois molécules d'eau (*fig.* 3).

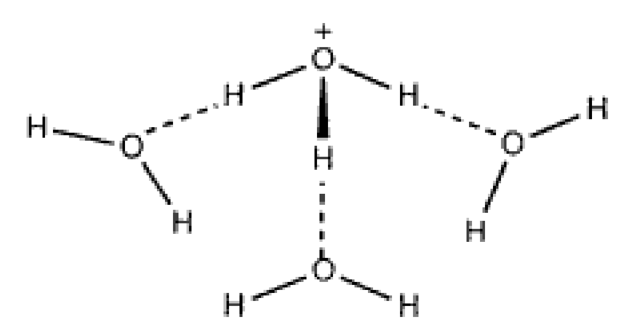


Figure 3. Structure du cation oxonium dans l'eau.

En bref, on peut considérer que le proton dans l'eau existe sous forme de tétrahydrate dont une molécule d'eau est particulièrement fortement liée.
Dans ce qui suit, nous adapterons la terminologie de Bates en désignant par ion hydrogène le proton solvaté qui sera symbolisé indifféremment H^+ (aq) ou H_3O^+ (aq).

c) Échange de proton en solution

Puisque le proton n'existe pas à l'état libre en solution, il résulte que les équations précédentes (11) (12) (13) et (14) sont purement conceptuelles. Par exemple, les acides ne se dissocient pas spontanément selon l'expression (11). Il faut, pour que l'acide manifeste ses propriétés, qu'il y ait un accepteur de protons et inversement. Cette conception fait partie intégrante de la théorie de Bronsted-Lowry.
Ainsi, toute réaction acide-base doit s'écrire :

$$\text{acide}_1 + \text{base}_2 \rightleftharpoons \text{acide}_2 + \text{base}_1$$

C'est le seul phénomène que l'on puisse observer. Les réactions de ce type sont appelées réactions de *protolyse*.
L'équilibre précédent peut être conçu comme résultant de la superposition des deux demi-réactions théoriques [9] :

$$\text{acide}_1 \rightleftharpoons \text{base}_1 + H^+$$

$$\text{base}_2 + H^+ \rightleftharpoons \text{acide}_2$$

Le *solvant* peut participer effectivement à l'échange de protons. D'ailleurs, lorsque dans le langage courant, on dit qu'un composé HA est un acide sans mention supplémentaire, on sous-entend que dans l'eau se déroule la réaction :

$$HA\ (aq) + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+\ (aq) + A^-\ (aq)$$

9. Cette conception est tout à fait analogue à celle concernant les réactions redox qui peuvent être « éclatées » en demi-réactions redox faisant intervenir les électrons. Certains auteurs utilisent un symbolisme particulier pour ces particules échangées qui n'ont pas de statut thermodynamique, puisque dans les conditions invoquées elles n'existent pas.

C'est le solvant, la base H_2O, qui révèle ici le caractère acide du composé HA. Il en est de même pour une espèce basique B qui est révélée par le solvant eau qui est un acide selon :

$$B\ (aq) + H_2O \rightleftharpoons BH^+\ (aq) + OH^-\ (aq)$$

Dans l'équilibre (15), une molécule d'eau est une base :

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+\ (aq) + OH^-\ (aq) \qquad (15)$$

et révèle le caractère acide d'une autre molécule d'eau. Les équations (13) et (14) sont les deux demi-réactions théoriques correspondantes.
Nous constatons à propos de ces exemples impliquant le solvant eau que celle-ci a une action purement chimique en captant ou en cédant un proton. On dit qu'elle possède un *pouvoir prototropique*. On peut donc considérer que l'eau joue un triple rôle : un rôle ionisant (pouvoir prototropique), dissociant (forte constante diélectrique) et solvatant des différentes espèces. Ce triple rôle n'est pas partagé par tous les solvants. Par exemple, l'acide acétique n'est pratiquement pas dissociant étant donné sa faible constante diélectrique.

B. Force des acides et des bases

1. Caractère relatif de la force des acides et des bases

Soit l'acide HA dans l'eau qui joue le rôle de base. La force de l'acide est liée à l'importance du transfert de protons :
- l'acide est fort si le transfert est total :

$$HA\ (aq) + H_2O \longrightarrow H_3O^+\ (aq) + A^-\ (aq)$$

- l'acide est faible si le transfert est partiel :

$$Ha\ (aq) + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+\ (aq) + A^-\ (aq)$$

La force d'un acide *dépend donc de son aptitude intrinsèque, plus ou moins grande, à donner des protons*. Mais ce n'est pas le seul facteur qui joue. En effet, en solution les protons n'existent pas à l'état libre. Ils ne peuvent être que transférés. *Il faut donc prendre aussi* en compte l'aptitude du solvant à accepter les protons. Ainsi un acide peut être fort dans l'eau et être faible dans un autre solvant. Un exemple est le gaz chlorhydrique qui est :
- un acide fort dans l'eau, selon la réaction totale :

$$HCl\ (g) + H_2O \longrightarrow H_3O^+\ (aq) + Cl^-\ (aq)$$

- un acide faible dans l'acide acétique qui joue le rôle ici de solvant à caractère basique selon l'équilibre :

$$HCl\ (g) + CH_3CO_2H \rightleftharpoons CH_3\ CO_2H_2^+\ (s) + Cl^-\ (s) \quad (s : \text{solvant})$$

Cet exemple montre sans ambiguïté l'influence du solvant puisque dans les deux cas c'est le même acide qui est en jeu.

En conséquence, le produit ionique de l'eau s'écrit :

$$K_e = a_{H_3O} + a_{OH^-} \quad (19)$$

et à 25 °C $K_e = 1{,}008.10^{-14}$ (activités basées sur l'échelle des concentrations molaires).

Lorsqu'il existe d'autres espèces en solution, l'eau reste bien entendu soumise au phénomène de dissociation chiffré par la constante d'équilibre K_e. En conséquence, la relation (19) est vérifiée quelles que soient les espèces en solution, pourvu que la solution reste diluée. On dit, dans le langage courant, que le produit ionique de l'eau est vérifié.

Les solutions pour lesquelles $a_H > a_{OH}$ sont appelées *solutions acides*. Celles pour lesquelles $a_{OH} > a_H$ sont appelées *solutions basiques*. En conséquence, si l'on ajoute à de l'eau un acide qui après dissolution augmente la concentration en ions H^+(aq), il y a obligatoirement diminution concomitante des ions OH^-(aq) pour que le produit ionique reste vérifié. Il se déroule un phénomène analogue lors de l'addition d'une base.

Comme toute constante d'équilibre, le produit ionique de l'eau varie avec la température. Par exemple :

$K_e = 5{,}6 \cdot 10^{-14}$ à 50 °C

et $K_e = 6{,}0 \cdot 10^{-13}$ à 100 °C

La dissociation de l'eau augmente avec la température.

3. Inutilité de la notion de K_B

Reprenons l'exemple du couple acide et base conjugués HA/A^-. Si l'on exprime le produit K_aK_b :

$$K_aK_b = \frac{a_H a_A}{a_{HA}} \cdot \frac{a_{HA} a_{OH}}{a_A}$$

il vient : $K_aK_b = a_H a_{OH}$

soit : $K_aK_b = K_e$

La connaissance de K_a d'un acide permet immédiatement le calcul de K_b de la base conjuguée. Plus l'acide est fort, plus la base conjuguée est faible.

C. Acidité et basicité des solutions aqueuses : pH formel

Le chimiste danois Sörensen a souligné, le premier, le fait que la concentration en protons est une variable importante qui conditionne de très nombreuses réactions chimiques et biochimiques. Par exemple, le degré d'ionisation α d'un acide dans l'eau, défini par l'expression [11] :

$$\alpha = \frac{[A^-_{aq}]}{[HA_{aq}] + [A^-_{aq}]}$$

11. Cette relation se démontre immédiatement en se servant de l'expression de la conservation de la matière et de la définition de K_a.

ne dépend que de la concentration en protons via la relation :

$$\alpha = \frac{K_{a_c}}{K_{a_c} + [H^+_{aq}]}$$

C'est la raison pour laquelle Sörensen a proposé *dans un premier temps* d'identifier *l'acidité d'une solution à la concentration en ion hydrogène.* Afin d'éviter les exposants négatifs dus aux faibles valeurs des concentrations, Sörensen a proposé la notion de pH définie par l'expression :

$$pH = -\log[H^+ (aq)]$$

L'échelle de pH proposée par Sörensen était basée sur la mesure de la fem de piles avec jonction du type :

$$Pt \mid H_2 (g) \mid \text{solution acide} \mid\mid KCl (aq) \mid Ag\,Cl (s) \mid Ag$$

Mais lui-même réalisa, très rapidement, que la fem de cette cellule ne dépend pas des concentrations des espèces impliquées dans la réaction de cellule mais de leurs activités. C'est la raison pour laquelle il a redéfini ultérieurement le pH par la relation

$$pH = -\log a_H \qquad (20)$$

où a_H est l'activité du proton hydraté appelée aussi activité protonique ou activité de l'ion hydrogène.

Cette définition porte le nom de *définition formelle* du pH.

Le pH est le logarithme décimal changé de signe de l'activité du proton hydraté dans la solution. L'échelle de concentration sur laquelle est basée l'activité est l'échelle des molalités.

On a donc [12] :

$$pH = -\log m_H \gamma_H \qquad (21)$$

On peut s'interroger sur la signification physique du pH. Selon certains auteurs, l'activité de l'ion hydrogène est en quelque sorte le degré de liaison du proton avec la solution. Plus ce degré est faible, plus la solution est acide. L'activité protonique est, en tout cas, le chiffrage de l'acidité instantanée d'une solution. Ce n'est pas son acidité totale qui nécessite la mise en œuvre d'une réaction chimique de protolyse totale pour l'apprécier. Il faut, en effet, savoir que si Bronsted considérait la mesure de l'activité protonique comme la seule mesure logique de l'acidité, Hantzsch avait proposé, quant à lui, la deuxième voie qu'il considère comme un meilleur index de l'acidité de la solution.

C'est donc la proposition de Bronsted qui est retenue pour les solutions aqueuses usuelles. Par contre, nous verrons que les fonctions d'acidité de Hammett sont basées sur la mise en œuvre d'une réaction de protolyse.

12. En réalité, le pH que l'on peut définir d'après l'échelle des molarités diffère très peu du précédent. À 25 °C et à toute température inférieure, on calcule la différence :

$$(paH)_m - (paH)_c = 0{,}001 \text{ unité}$$

À 100 °C elle s'élève à 0,019 unité. Ceci s'explique par le fait qu'en solutions diluées, la molarité et la molalité ne diffèrent que très peu l'une de l'autre et par le fait que d'autre part le pH ne garde une signification thermodynamique, justement, qu'en solutions diluées.

La définition formelle du pH en termes d'activité de l'ion hydrogène entraîne des difficultés importantes et elle impose une *définition opérationnelle ou pratique* du pH. Avant d'exposer ces difficultés, nous allons rappeler quelques propriétés des solutions tampon dont l'utilisation fait partie intégrante de la définition opérationnelle du pH.

D. Solutions tampon – Pouvoir tampon

1. Intérêt et constitution des solutions tampon : effet tampon

Dans de nombreuses branches de la chimie et en particulier en analyse chimique et biochimique, il est nécessaire de garder le pH d'une solution constante, notamment au cours d'une réaction qui produit ou consomme des protons. Pour atteindre ce but, on utilise une solution tampon.

Les solutions tampon sont des solutions plutôt [13] concentrées d'un acide faible et de sa base conjuguée qui ne participent pas eux-mêmes à la réaction principale. Si des protons sont libérés au cours de celle-ci, ils réagissent avec la base pour augmenter la concentration de l'acide conjugué. Si des protons sont consommés, l'acide faible se dissocie en donnant la base conjuguée.

Lorsqu'on ajoute un acide ou une base à une solution tampon, la variation de pH est très faible, en tout cas beaucoup plus faible que lorsqu'on ajoute un acide ou une base au solvant pur. Par exemple, si à la solution tampon constituée en dissolvant 10^{-2} mol d'acide acétique et 10^{-2} mol d'acétate de sodium par dm^3 de solution ($K_a = 1{,}75.10^{-5}$), on ajoute une solution d'acide chlorhydrique de telle sorte que sa concentration analytique finale soit 10^{-3} $mol.dm^{-3}$, le pH varie de 4,75 à 4,67. À titre de comparaison, la préparation d'une solution 10^{-3} $mol.dm^{-3}$ d'acide chlorhydrique à partir de l'eau pure fait varier le pH de 7 à 3. La quasi-constance du pH lorsqu'un acide ou une base est ajoutée à une solution tampon s'appelle *l'effet tampon*.

2. Calcul du pH des solutions tampon

Ces calculs sont donnés afin de préciser l'origine de l'effet tampon. Ils sont effectués en raisonnant uniquement avec les concentrations. Ceci est en toute rigueur incorrect puisque les solutions tampon sont plutôt concentrées et on ne peut donc confondre activités et concentrations. Cependant, cette façon de raisonner conduit aux mêmes conclusions quant à l'origine de l'effet tampon. À la fin de ce paragraphe nous dirons très brièvement comment le pH des solutions est calculé en tenant compte des activités.

a) pH d'une solution tampon avant consommation ou addition de proton

Soit donc une solution tampon préparée en dissolvant C_{HA} $mol.dm^{-3}$ d'acide et C_A $mol.dm^{-3}$ de la base conjuguée sous forme de sels de sodium ANa.

---

13. Le domaine des concentrations des différentes espèces constituant une solution tampon est précisé ci-dessous.

$$pH = pK_{a_c} + \log\frac{C_A - C}{C_{HA} + C} \quad (25)$$

Après addition d'une base, nous aurions trouvé :

$$pH = pK_{a_c} + \log\frac{C_A + C}{C_{HA} - C} \quad (26)$$

Rappelons que les équations (23) (25) (26) ne sont légitimes que lorsque $[H^+]$ et $[OH^-]$ sont négligeables dans les équations (22) et (24) c'est-à-dire lorsque

$$[Na^+] \gg [H^+]$$

et

$$[A^-] \gg [OH^-]$$

Autrement dit, il faut que les deux formes du tampon soient en concentration suffisamment élevée. Le domaine de concentration pour que l'approximation soit valable dépend de l'acidité du milieu. Les expressions (25) et (26) peuvent encore se simplifier lorsque la concentration de l'acide ou de la base ajoutée à la solution tampon est très faible c'est-à-dire si

$c \ll C_A$

$c \ll C_{HA}$

Dans ces conditions, le pH de la solution tampon ne varie pas.

b) Calcul prenant en compte les activités

Le calcul (rigoureux) du pH prenant en compte les activités présente une difficulté initiale. Si l'on prend, par exemple, les six équations conduisant à l'expression (25), on s'aperçoit que celles-ci ne sont pas homogènes car K_a et K_e s'expriment en termes d'activités tandis que les bilans matière et l'électroneutralité s'expriment en concentrations. La difficulté est surmontée en opérant de la façon suivante. On commence par opérer comme précédemment, donc en « mélangeant » activités et concentrations, puisqu'on utilise simultanément les valeurs thermodynamiques K_a et K_e et les concentrations C_{HA}, C_A et C. Le calcul du pseudo pH permet celui des pseudoconcentrations de toutes les autres espèces (via les mêmes équations qui conduisent à la relation (25) et celui de la pseudo-force ionique. Celle-ci, via l'utilisation de formules du type Debye-Hückel, permet d'estimer un premier jeu de valeurs des constantes conditionnelles K_{ac} et K_{ec} à partir des valeurs thermodynamiques.

Le processus précédent est réitéré en utilisant ces valeurs conditionnelles jusqu'à ce que la force ionique reste constante [17]. Dans ces conditions, ce sont finalement les concentrations des espèces qui sont obtenues. Mais puisque la force ionique de la solution est connue, il est facile d'obtenir γ_H donc a_H et le pH.

Ce principe est applicable à toute solution aqueuse diluée.

17. En général quatre ou cinq itérations suffisent. Ces calculs peuvent être réalisés sur une calculatrice de poche programmable.

3. Origine de l'effet tampon

La comparaison des relations (25) et (23) montre que par addition de C moles d'acide fort, la concentration en acide HA augmente de C mol dm^{-3}, celle de la base conjuguée ayant diminué d'autant. En terme de bilan en quantité de matière, on peut donc écrire que par addition de l'acide fort il y a réalisation de la réaction totale

$$A^- + H^+ \longrightarrow HA$$

C moles ajoutées   C moles formées

D'un *point de vue chimique*, on peut donc considérer que l'origine de l'effet tampon est le remplacement mole à mole du proton (entité acide la plus forte que l'on puisse trouver) par l'acide faible du tampon, très peu dissocié.
Une autre origine de l'effet tampon tient à la définition logarithmique du pH et aux propriétés de la fonction mathématique :

$$y = \log\frac{a - x}{a + x} + b$$

qui présente une variation faible autour de son centre de symétrie.

4. Pouvoir tampon

Une mesure du pouvoir tampon est la quantité d'un acide fort (ou d'une base forte) requise pour changer le pH de la solution d'une quantité donnée. Plus il faut ajouter d'acide fort, meilleur est le pouvoir tampon. Von Slyke a défini le pouvoir tampon de la façon suivante : si lors de l'addition de dc_b moles d'une base forte à 1 dm^3 de solution tampon, il y a une augmentation de son pH de dpH, le pouvoir tampon β est

$$\beta = \frac{dC_b}{dpH}$$

Lors de l'addition de dc_a moles d'un *acide fort*, le pouvoir tampon est défini par

$$\beta = -\frac{dC_a}{dpH}$$

Le signe moins est introduit dans la définition pour que β reste positif. L'écriture différentielle est nécessaire car comme nous le montrons ci-dessous, le pouvoir tampon varie avec le pH de la solution :

Expression du pouvoir tampon

Considérons une solution tampon contenant :

- au total C moles.dm^{-3} d'acide conjugué et de la base correspondante. Les C mol.dm^{-3} ont été ajoutées par dissolution de l'acide HA suivie par l'addition de C_b mol.dm^{-3} d'hydroxyde de sodium. L'hydroxyde de sodium est nécessaire pour neutraliser une partie de l'acide conjugué afin de réaliser la solution tampon ;
- C_a mol.dm^{-3} d'acide chlorhydrique. L'addition d'acide chlorhydrique n'est nécessaire que si l'on veut étudier le comportement de la solution tampon vis-à-vis de l'addition d'un acide.

Les données précédentes se traduisent par les relations (en raisonnant sur les concentrations)

$[H^+]\ [A^-] = K_{a_c}\ [HA]$

$[H^+]\ [OH^-] = K_{e_c}$

$[Na^+] = C_b$

$[Cl^-] = C_a$

$[HA] + [A^-] = C$

$[H^+] + [Na^+] = [OH^-] + [Cl^-] + [A^-]$

En combinant la première et la dernière de ces relations, on trouve

$$[A^-] = \frac{CK_{a_c}}{K_{a_c} + [H^+]}$$

puis à l'aide des autres équations

$$C_b = C_a + \frac{K_{e_c}}{[H^+]} - [H^+] + \frac{CK_{a_c}}{K_{a_c} + [H^+]}$$

Le calcul du pouvoir tampon est immédiat.

Lors de l'addition *d'hydroxyde de sodium*, on pose $\beta = \frac{dC_b}{dpH}$.

Lors de l'addition *d'acide chlorhydrique*, on pose $\beta = \frac{-dC_a}{dpH}$.

Dans les deux cas, on trouve [18]

$$\beta = 2,303\left(\frac{K_{e_c}}{[H^+]} + [H^+] + \frac{CK_{a_c}[H^+]}{[K_{a_c} + [H^+]]^2}\right)$$

À partir de cette expression, on peut faire les constatations suivantes :

- les deux premiers termes du membre de droite expriment le pouvoir tampon de l'eau, c'est-à-dire, respectivement, des deux couples conjugués H_2O/OH^- et H_3O^+/H_2O ;
- le dernier terme exprime le pouvoir tampon dû au couple HA/A^-. Il est facile de vérifier l'égalité

$$\frac{CK_{a_c}[H^+]}{[K_{a_c} + [H^+]]^2} = \frac{C_{HA} \cdot C_A}{C_{HA} + C_A}$$

- le pouvoir tampon varie avec le pH. Il est tout aussi facile de vérifier que le pouvoir tampon dû au couple HA/A^- passe par un maximum lorsque l'on a

$$[HA] = [A^-] \quad \text{ou} \quad C_{HA} = C_A$$

En effet $\frac{d\beta}{d[H^+]} = 0$ si $[H+] = K_{a_c}$

18. La dérivation s'effectue par la règle de dérivation en chaîne $\frac{dC_b}{dpH} = \frac{dC_b}{d[H^+]} \cdot \frac{d[H^+]}{dpH}$.

Dans ce cas, $\beta = 0{,}57$. β est indépendante de la valeur K_a. La *figure* 4 donne le pouvoir tampon du couple CH_3COOH/CH_3COO^- en fonction du pH.

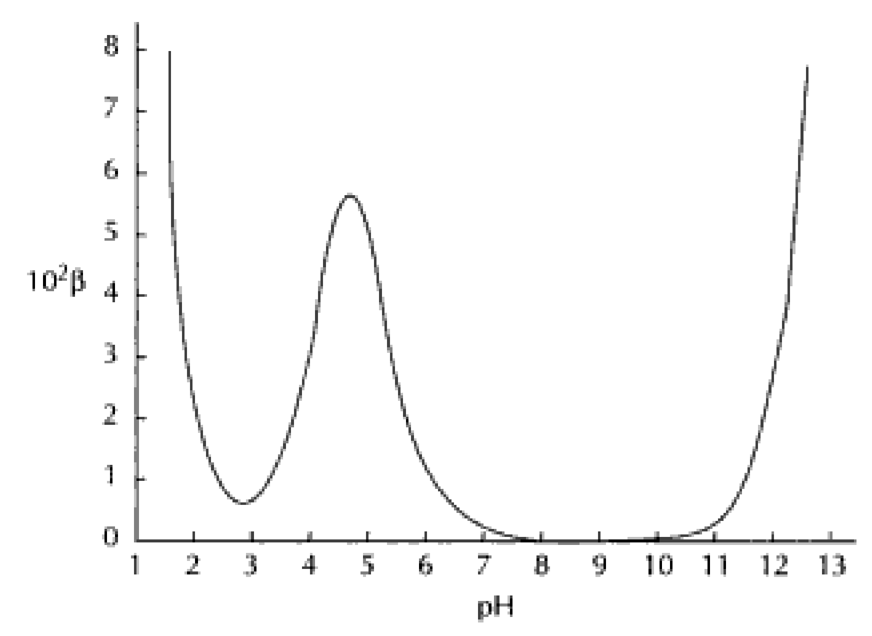


Figure 4. Pouvoir tampon du couple CH_3COOH/CH_3COO^- en fonction du pH ($C_{HA} + C_A = 0{,}1$ mol.dm^{-3}).

Les minimums du pouvoir tampon correspondent à l'acide acétique seul et à l'ion acétate seul. Ce dernier est nul. Le premier ne l'est pas car, dans la zone où l'acide acétique est seul, le pouvoir tampon du couple H_3O^+/H_2O se fait déjà sentir. Dans les zones extrêmes de pH les pouvoirs tampon des couples H_3O^+/H_2O et H_2O/OH^- sont énormes. Remarquons enfin que la zone où le pouvoir tampon du couple HA/A^- est perceptible s'échelonne sensiblement sur trois unités pH. C'est le *domaine d'action du tampon*.

5. Dilution des tampons

La relation (23) montre que le pH d'une solution tampon est insensible à la concentration totale $C_{HA} + C_A$ pourvu que le rapport C_A/C_{HA} reste constant. Le pH d'une solution tampon est donc insensible à la dilution. Ceci n'est vrai que lorsque la relation (23) est légitime, c'est-à-dire lorsque $[OH^-]$ et $[H^+]$ sont négligeables devant $[A^-]$ et $[HA]$ ce qui n'est plus le cas lorsque la dilution devient importante. La *figure 5* montre la variation du pH d'une solution équimoléculaire d'acide acétique et d'acétate de sodium en fonction de la concentration de ces espèces. Évidemment, lorsque la solution est très diluée le pH est celui de l'eau pure. Conventionnellement, pour chiffrer le comportement d'une solution tampon lors de la dilution, on mesure la variation ΔpH due à l'addition d'un volume d'eau égal à celui de la solution.

Il ne faut pas perdre de vue que les effets de dilution ne sont pas dus uniquement aux variations de concentrations mais sont dus aussi aux variations des coefficients d'activité liés à la diminution des forces ioniques. (Les considérations des deux paragraphes précédents ont été données, par souci de simplification, en termes de concentrations).

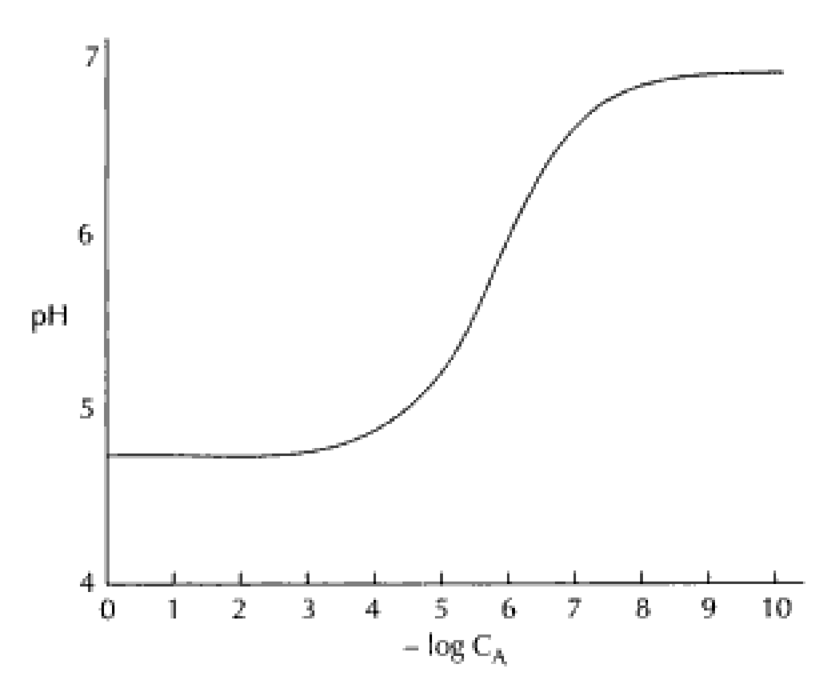


Figure 5. pH d'une solution d'un mélange équimoléculaire acide acétique – acétate de sodium en fonction de la dilution ($C_A = C_{HA}$)

6. Effets de sels

L'effet de l'addition d'un sel neutre à une solution tampon est prévisible, au moins d'un point de vue qualitatif, en prenant en considération l'équilibre acide-base :

- Pour un couple du type HA/A^-, le pH est donné par la relation

$$pH = pK_a + \log\frac{m_{A^-}}{m_{HA}} + \log\frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}} \tag{27}$$

Lors de l'addition d'un sel neutre, seul γ_{A-} varie sensiblement puisque l'on peut considérer que γ_{HA} ne varie pas (cf. précédemment : coefficients d'activité des solutés non chargés). Puisque d'après la théorie de Debye et Hückel γ_{A-} diminue, le pH diminue. Par exemple pour le tampon acétique avec $C_{HA} = C_A = 0{,}005$ mol.dm^{-3}, l'addition d'un sel neutre à la concentration 0,1 mol.dm^{-3} diminue le pH de 0,1 unité.

- Pour un couple du type BH^+/B dont le pH est donné par la relation

$$pH = pK_a + \log\frac{m_B}{m_{BH^+}} + \log\frac{\gamma_B}{\gamma_{BH^+}} \tag{28}$$

le pH va augmenter pour les mêmes raisons.

7. Effet de la température

Si l'on considère les relations (27) et (28), l'influence de la température sur le pH d'une solution tampon se fait sentir par la variation de la constante d'acidité et des coefficients d'activité, puisque les molalités sont indépendantes de la température (cf. précédemment – échelles de concentrations). Les coefficients

$$\left(\frac{\partial \log\gamma}{\partial T}\right)_{P,m}, \left(\frac{\partial \log K_a}{\partial T}\right)_P \quad \text{et} \quad \left(\frac{\partial \log K_e}{\partial T}\right)_P$$

sont calculables par des relations thermodynamiques en utilisant des données de la littérature. D'un point de vue qualitatif on peut considérer en première approximation qu'à pH acide, le pH tend à augmenter légèrement avec la température. À pH basique c'est l'inverse. Les variations sont faibles et se situent dans le domaine 1/1 000 – 1/100 pH.

E. pH des solutions aqueuses – Définition opérationnelle et principe de la mesure

1. Difficulté inhérente à la définition formelle du pH

La définition formelle du pH

$$pH = -\log a_H$$

porte en elle une difficulté considérable. C'est l'impossibilité de mesurer l'activité d'un ion et en particulier a_H. Certains auteurs (Bates) estiment même que l'activité d'un ion est un concept sans signification physique bien précise. D'un point de vue plus pratique, la définition du pH en terme d'activité pose un autre problème d'une autre nature. Ainsi en milieux biologiques, certains auteurs soulignent le fait que les équilibres électrolytiques se chiffrent en termes de concentrations et qu'en conséquence la valeur de pH doit être convertie en termes de concentrations avant d'être utilisable, ce qui implique de connaître γ_H. (En contrepartie, il est souvent rétorqué que les équilibres régis par les valeurs des potentiels chimiques sont fonction des activités et non pas des concentrations, quel que soit le milieu.)
On peut dès lors s'interroger sur l'intérêt de maintenir la définition de Sörensen. *La réponse se situe dans le domaine pratique*. À l'heure actuelle, on ne connaît pas de méthode expérimentale aussi pratique et aussi générale que la méthode électrométrique de Sörensen impliquant l'utilisation de la cellule

$$Pt \mid H_2\,(g) \mid \text{ solution acide } \mid\mid KCl\,(aq) \mid Ag\,Cl\,(s) \mid Ag$$

Or la théorie thermodynamique démontre clairement que ces cellules répondent aux activités des ions et non aux concentrations. Ainsi se trouve justifiée la définition formelle.
Il en résulte que la détermination expérimentale du pH doit impliquer une hypothèse, à un moment donné, sur l'activité d'un ion dans des conditions données. Les valeurs de pH mesurées sont, dès lors, conventionnelles. Mais l'hypothèse doit être en accord avec la définition formelle du pH. À cette condition seulement, la valeur mesurée du pH conduit à des déterminations des constantes d'équilibre que l'on peut considérer comme thermodynamiques.
Précisons cette difficulté en considérant la cellule de Sörensen.
On sait que la réaction chimique qui lui correspond s'écrit

$$AgCl\,(s) + 1/2\,H_2\,(g) \rightarrow Ag(s) + Cl^-\,(aq) + H^+\,(aq)$$

Le potentiel de la cellule est donné par la relation [19]

$$E = E^o - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{Cl^-} a_{H^+}}{a_{H_2}^{1/2}} + Ej$$

19. Compte tenu des conventions usuelles sur les activités.

3. Attribution conventionnelle d'une valeur de pH aux solutions standards – Échelle de pH du NBS

Il s'agit donc maintenant d'attribuer une *valeur de pH à la solution standard S compatible avec la définition formelle*. Plusieurs procédés sont proposés pour attribuer les valeurs de pH aux solutions standard. Il en résulte plusieurs échelles de pH légèrement différentes. Nous ne développons ici que l'échelle proposée par le NBS [20] (échelle de Bates) qui est d'ailleurs celle retenue par la pharmacopée française (X^e édition) et la pharmacopée européenne. Commençons par dire que l'attribution de valeurs de pH (compatibles avec la définition formelle) aux solutions standard ne peut être vérifiée directement, mais peut l'être en partie indirectement. En effet, si la valeur du pH d'une solution est la même quelle que soit la solution standard utilisée, il est hautement probable que la définition formelle du pH soit respectée. Ceci constitue une preuve de la cohérence interne de l'échelle de pH.

Les solutions standard sont des solutions tampon dont le pH est évalué de la façon suivante. Le tampon choisi est inséré dans la cellule du type Harned sans jonction

$$Pt \mid H_2\,(g) \mid \text{solution tampon} \mid Ag\,Cl\,(s) \mid Ag\,(s) \qquad (31)$$

dont nous savons que le potentiel est

$$E = E^o(AgCl/Ag) - \frac{RT}{F}\ln\frac{a_H a_{Cl}}{(aH_2)^{1/2}} + Ej$$

En opérant avec une pression de 1 bar d'hydrogène et en introduisant l'identité,

$$a_{Cl^-} = m_{Cl^-}\gamma_{Cl^-}$$

Cette relation peut s'écrire

$$-\log_{10}(a_H\gamma_{Cl}) = \frac{(E - E^o)F}{2{,}303RT} + \log m_{Cl^-}$$

Il doit être bien clair que γ_{Cl^-} et a_H seuls ne sont pas accessibles. Par contre, le produit $a_H\,\gamma_{Cl}$ l'est.

Les trois étapes de l'assignation du pH sont :

- la détermination de $-\log_{10}(a_H\,\gamma_{Cl})$ pour plusieurs solutions contenant la même concentration en tampons et des concentrations différentes en ions chlorure à l'aide de la cellule précédente (dont la reproductibilité est excellente) ;
- obtention de $-\log_{10}(a_H\,\gamma_{Cl})^o$ par extrapolation des valeurs précédentes à molalité m_{Cl} nulle. Cette valeur n'est pas égale à $-\log_{10} a_H$ car il subsiste le coefficient d'activité des ions chlorure à la force ionique de la solution tampon seule (dénuée d'ions chlorure) ;
- calcul du pH par la relation

$$pH = -\log_{10}(a_H\gamma_{Cl})^o + \log\gamma_{Cl}$$

Le coefficient d'activité est calculé, pour la force ionique du tampon, par la relation de Bates-Guggenheim

$$\log\gamma_{Cl} = -\frac{AI^{1/2}}{1 + 1{,}5I^{1/2}}$$

20. National Bureau of standards (États-Unis).

Elles sont nivelées, du point de vue de la basicité au niveau de l'ion hydroxyde. C'est le cas des ions éthylate, amidure. Rappelons que les prévisions précédentes à l'aide des valeurs des pK_a des couples positionnés sur l'échelle d'acido-basicité ne sont réalisables qu'en solutions diluées. En effet, les valeurs de K_a ne chiffrent la force des acides et des bases que lorsque $a_{H_2O} = 1$, ce qui implique que les solutions soient diluées.

G. Problème de chiffrage de l'acidité (ou de la basicité) des solutions concentrées, fonction d'acidité de Hammett

1. Le pH mauvais indicateur de l'acidité des solutions concentrées en acide ou en base

C'est un fait expérimental que l'acidité des solutions concentrées d'acides, estimée par exemple par leur pouvoir catalytique sur certaines réactions ou par leur pouvoir dissolvant de certaines bases très faibles ou encore par leur effet sur les indicateurs colorés, augmente considérablement plus que ne le laisse supposer la mesure de la concentration en ions hydrogène ou son activité (*cf. fig. 8*, ci-après). La cause de ce phénomène a déjà été donnée brièvement précédemment. C'est le manque de molécules d'eau disponibles pour solvater tous les ions hydrogène théoriquement transférables à partir de la solution d'acide fort concentrée. Les acides forts en solution concentrée se trouvent donc considérablement moins dissociés que ne le laisse prévoir leur comportement en solution diluée. Par exemple, des mesures de la constante de dissociation de l'acide perchlorique par spectroscopie Raman et par résonance magnétique nucléaire en solutions très concentrées conduisent à une valeur $K_a = 40$ qui n'a strictement rien à voir avec la valeur $K_a \simeq 10^{12}$ calculée en solution diluée. En conséquence, le pH est une mauvaise estimation de l'acidité des solutions acides concentrées. Des considérations analogues peuvent être données pour des solutions très concentrées en bases.
D'autre part, il ne faut pas perdre de vue que des solutions aussi concentrées sont très loin, du point de vue des conditions de dilution, de celles utilisées pour définir l'échelle de pH. La mesure de leur pH est donc sans signification thermodynamique.

2. Fonction d'acidité de Hammett

Un meilleur concept permettant de chiffrer l'acidité des solutions concentrées est celui de *fonction d'acidité* introduit par Hammett (1932). L'utilisation des fonctions d'acidité est intéressante d'un point de vue théorique car elle a permis de comparer les niveaux d'acidité absolue dans différents solvants. D'un point de vue plus pratique, elles permettent d'obtenir des valeurs de pK_a de différents couples inaccessibles dans l'eau, en particulier les valeurs qui sont proches de O et 14 qui nécessitent pour les déterminer des valeurs de pH de cet ordre de grandeur dont la signification physique est douteuse. Le principe de l'établissement des fonctions d'acidité est le même que celui de la détermination spectrophotométrique du pH.

a) Détermination spectrophotométrique du pH

Rappelons que le rapport des concentrations [B] et [BH⁺] des formes basique et acide d'un indicateur est accessible à partir de la mesure de la densité optique de la solution une fois obtenus au préalable les coefficients d'extinction moléculaire de ces formes pures. En utilisant des solutions de pH connus, la constante d'ionisation K_a de l'indicateur est accessible. En effet,

$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]} \cdot \frac{y_H + y_B}{y_{BH^+}}$$

ou

$$pK_a = pH - \log\frac{[B]}{[BH^+]} - \log\frac{y_B}{y_{BH^+}}$$

On mesure donc les deux premiers termes du membre de droite pour plusieurs forces ioniques et on extrapole les valeurs de pK_a pour une dilution infinie. Réciproquement, une fois la valeur K_a connue, la mesure du rapport [B]/[BH⁺] pour une solution donnée permet de calculer son pH par la relation

$$pH = pK_a + \log\frac{[B]}{[BH^+]} + \log\frac{y_B}{y_{BH^+}}$$

Les valeurs exactes peuvent être ainsi obtenues pourvu que la force ionique de la solution reste inférieure à 0,1 $mol.dm^{-3}$ pour permettre une estimation correcte de Y_{BH^+}

b) La fonction d'acidité de Hammett

D'après ce que nous avons dit précédemment, au fur et à mesure que la concentration de l'acide en solution augmente plus la force ionique augmente et moins la relation précédente devient utilisable. Hammett et Deyrup ont proposé un autre concept pour mesurer l'acidité de solutions concentrées, en mesurant par voie spectrophotométrique le degré de protonation d'indicateurs faiblement basiques en solution suivant l'équilibre

$$B + H^+ \rightleftharpoons BH^+$$

Hammett et Deyrup ont proposé de chiffrer l'acidité d'une solution par la valeur de la fonction H_o définie par l'équation

$$H_o = pK_a - \log\frac{[BH^+]}{[B]} \qquad (33)$$

Ils ont également introduit une autre fonction, la fonction h_0 définie par

$$h_o = K_a\frac{[BH^+]}{[B]}$$

ou

$$h_o = \frac{a_{H^+} y_B}{y_{BH^+}}$$

Il en résulte que $H_o = -\log h_o$

$$H_o = -\log \frac{a_{H^+} y_B}{y_{BH^+}}$$

H_o et h_o jouent respectivement le rôle que jouent pH et a_H dans l'échelle de pH conventionnelle. Toutefois, il convient de remarquer que d'après la dernière relation h_o diffère de a_H du fait de la présence des coefficients d'activité y_B et y_{BH^+}. Plus fondamentalement, la fonction d'acidité mesure plutôt l'acidité totale d'une solution en mesurant la quantitativité d'une réaction chimique de protolyse et non pas l'activité en proton hydraté de la solution (cf. précédemment – activité et basicité des solutions aqueuses : pH formel).

À faibles forces ioniques $\quad y_B \rightarrow 1$ et $y_{BH} \rightarrow y_A$

et en conséquence $\quad H_o \rightarrow -\log C_{H^+}$

À dilution infinie, $\quad y_B = 1$

$$y_{BH} = 1$$

et $\quad H_o = -\log a_H$

$$H_o = \text{pH} \qquad \text{(dilution infinie)}$$

À dilution infinie H_o est superposable au pH. Donc H_o ne diffère du pH que pour les solutions acides non diluées. La fonction H_o d'une solution est évaluée à l'aide de la relation (33) via la mesure du rapport $[BH^+]/[B]$ par spectrophotométrie, le pK_a de l'indicateur étant connu. Les pK_a des indicateurs utilisés pour établir l'échelle sont déterminés de proche en proche. Un premier indicateur est choisi pour virer dans une zone acide de pH mesurable. Son pKa est donc accessible en solution aqueuse acide via la relation (32). Un autre indicateur plus faiblement basique que le précédent mais dont le domaine de virage se superpose partiellement à celui du premier est choisi pour mesurer l'acidité de la même solution. La fonction H_o doit être la même quel que soit l'indicateur utilisé et l'on peut écrire

$$pK_{a_1} - \log\frac{[BH_1^+]}{[B_1]} = pK_{a_2} - \log\frac{[BH_2^+]}{[B_2]} \qquad (34)$$

Puisque les rapports $[BH_1^+]/[B_1]$ et $[BH_2^+]/[B_2]$ sont accessibles par spectrophotométrie et pK_{a_1} étant déterminé dans l'eau, pK_{a_2} est accessible. Pour des solutions encore plus acides, on se sert du deuxième indicateur et d'un autre indicateur encore moins basique. Le pK_a de ce dernier est déterminé de la même façon et ainsi de suite. Des pK_a allant de 2,77 à – 12,78 ont été ainsi déterminés.

La *figure 8* indique la variation de H_o avec le pourcentage en poids d'acide sulfurique d'une solution acide sulfurique – eau.

À titre de comparaison, est donnée *figure 8* la variation de la fonction $\log[H_3O^+]$, la concentration $[H_3O^+]$ étant établie par des mesures de spectroscopie Raman. Les deux courbes sont superposables pour les faibles pourcentages d'acide sulfurique. C'est la zone où H_o et pH sont superposables. On constate que H_o prend des valeurs très importantes que ne prend pas $\log[H_3O^+]$. $\log[H_3O^+]$ décroît même rapidement en approchant dans la zone 80 à 100 p 100 d'acide sulfurique [24].

C'est une constatation expérimentale que les vitesses réactionnelles sont beaucoup mieux corrélées à la valeur H_o qu'à la valeur pH pour les solutions concentrées. Le

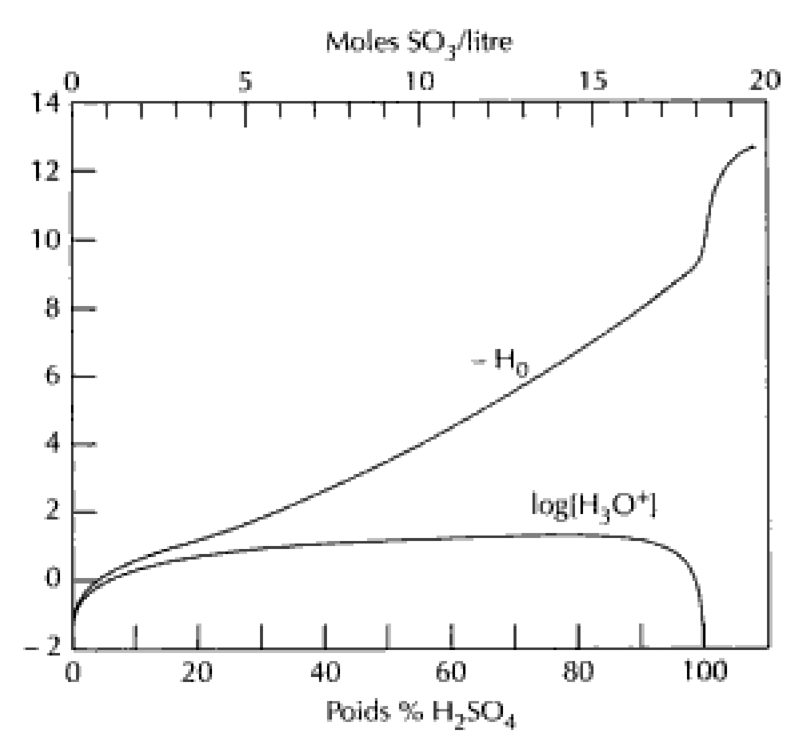


Figure 8. Comparaison des valeurs des fonctions H_0 et log[H_3O^+] pour différentes solutions d'acide sulfurique.

succès de la fonction d'acidité de Hammett provient du fait que H_0 est une propriété de la solution. H_0 est virtuellement indépendante de la nature de l'indicateur utilisé pourvu que comme le montre la relation (34), le rapport y_B/y_{BH^+} reste constant quel que soit l'indicateur. Ceci implique que les indicateurs soient du même type structural et que seule soit protonée la fonction basique. La similitude structurale n'est pas une condition suffisante pour que tel soit toujours le cas. Hammett avait utilisé initialement une série d'anilines mono et polysubstituées pour définir l'échelle H_0. H_0 mesure donc la tendance d'une solution à protoner une base neutre. D'autres indicateurs et donc d'autres fonctions d'acidité ont été proposées. Un autre succès de la fonction H_0 est qu'elle ne dépend pas de la nature du solvant, du moins tant que ceux-ci sont suffisamment ionisants pour que la formation de paires d'ions soit négligeable.

III. Réactions de formation des complexes

A. Considérations générales et terminologie

Les complexes peuvent être considérés comme des associations formées entre un ou plusieurs ions métalliques (fréquemment un) et des anions ou des molécules minéraux ou organiques. L'ion métallique est appelé *l'ion coordina-*

24. La valeur H_0 la plus basse connue est obtenue avec le mélange $HSO_3F + SbF_5$ (14,1 mol p. 100) : $H_0 = -26{,}5$.

teur ou *noyau*. Les espèces associées sont appelées *coordinats* ou *ligands*. Werner (1905) a montré qu'un trait caractéristique de la chimie des complexes est que les ligands neutres sont liés *directement* au métal. Ceci permet de distinguer les complexes des sels. Par exemple, l'espèce de formule brute Co Cl_3 N_6 H_{18} n'est pas le chlorure de cobalt^{III} solvaté par six molécules d'ammoniac Co Cl_3, $6NH_3$ mais le complexe cobalt^{III} hexammine $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, $3Cl^-$. Nous verrons à la fin de ce paragraphe que cette propriété a des conséquences stéréochimiques.

Un *ligand* est défini comme toute molécule ou ion possédant au moins un doublet électronique qui peut être partagé avec le métal. Les ligands sont donc des *bases de Lewis* et, selon la terminologie des chimistes organiciens, ce sont des nucléophiles. Les ions métalliques sont des *acides de Lewis* électrophiles. Il existe *plusieurs classifications possibles des ligands*. Nous en mentionnons deux :

- une *première* basée sur le type de liaison existant entre l'atome central et les ligands. On distingue alors deux classes de ligands :
  - les *ligands classiques* qui sont *simplement* donneurs d'un doublet électronique. Ils forment des complexes avec les ions métalliques des groupes principaux de la classification périodique et avec notamment les ions des métaux de transition. La chimie de ces complexes est très largement une chimie en solution aqueuse. Les ligands contiennent souvent un atome d'azote, d'halogène ou d'oxygène donneurs. D'autre part, les ions métalliques sont dans un état d'oxydation positif. Nous ne nous intéresserons qu'aux complexes formés avec ces ligands, car ce sont eux qui ont reçu le plus d'applications en analyse chimique ;
  - les *ligands non classiques* (« Π-bonding » et Π-acid ligands), qui ne donnent essentiellement des complexes qu'avec les métaux de transition. Nous nous bornons à dire seulement ici que ces ligands ont à la fois des propriétés de donneur et d'accepteur d'électrons ;
- la *deuxième* classification que nous retenons est d'ordre structural. Elle est basée sur le nombre de points d'attache du ligand avec l'atome central. On distingue les ligands *unidentates ou monodentates*. Le ligand est lié à l'ion métallique par un seul point d'attache par donation d'une paire d'électrons au métal. Ex. : H_2O, NH_3, X- (halogénures). Un ligand avec deux atomes donneurs est appelé *ligand bidentate*. Ex. : NH_2–CH_2CH_2–NH_2 (éthylènediamine). On distingue aussi des ligands tridentates, tétradentates et plus généralement multidentates.
- Un ligand polydentate lorsqu'il est lié entièrement au même atome central est appelé *chélate*. Le ligand lui-même est appelé agent chélateur ou chélatant. Ainsi, par exemple, dans le tris(éthylènediamine) cobalt^{III} (*fig.* 9), l'éthylènediamine est un ligand bidentate et un agent chélateur.

  Un chélate particulièrement important est le complexon IV qui est le tétranion de l'acide éthylènediaminotétracétique ou EDTA (*fig.* 9).

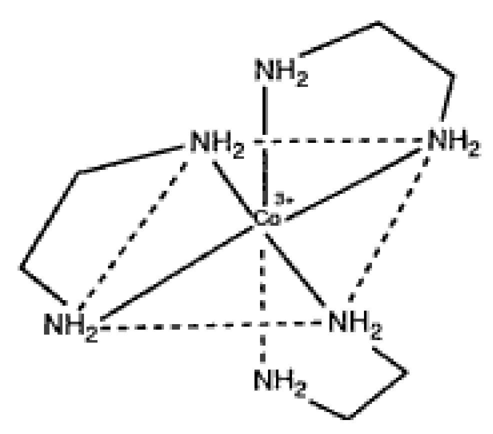


Figure 9. Structure du tris(éthylènediamine) cobalt^{III}.

B. Réaction de formation des complexes

Nous avons rappelé précédemment (état des espèces ioniques en solution aqueuse-cas des ions métalliques) que de nombreux ions métalliques donnent dans l'eau des complexes aqua dans lesquels le ligand H_2O est lié par une véritable liaison à l'ion métallique central. La réaction de formation d'un complexe invoque donc le remplacement de une ou plusieurs molécules de solvant (usuellement l'eau) coordinée(s) initialement avec le métal par un ou plusieurs ligands suivant le schéma

$$M(H_2O)_n(aq) + L(aq) \rightarrow M(H_2O)_{n-1}\,L(aq) + H_2O$$

$$M(H_2O)_{n-1}\,L(aq) + L(aq) \rightarrow M(H_2O)_{n-2}\,L_2(aq) + H_2O$$

- -

$$M(H_2O)\,L_{n-1}(aq) + L(aq) \rightarrow ML_n(aq) + H_2O \qquad (35)$$

Volontairement, dans les équations (35), nous avons omis la charge de l'ion métallique et, lorsqu'elle existe, celle du ligand. En conséquence, l'écriture ML_n n'implique pas obligatoirement que cette espèce soit neutre. Sa charge dépend de celle de l'ion, de celle du ligand et de la valeur de n. L'espèce ML_n est appelée *complexe ultime*. n est *l'indice de coordination*, ou *coordinence* ou *nombre de coordination* de l'ion métallique, et représente le nombre maximal de ligands monodentates qui peuvent lui être liés. Le plus souvent il est égal à 6, mais il peut prendre des valeurs 2, 4 et 8. L'indice de coordinence dépasse la valeur de la valence classique de l'ion central dans ses composés usuels.
De nombreux facteurs autres que ceux structuraux brièvement évoqués ci-dessus influencent la formation des complexes. Ce sont, par exemple, le pH de la solution, la solubilité des espèces participant à la complexation, l'existence d'autres agents complexants etc. Ces facteurs seront envisagés ci-après (facteurs influençant la formation des complexes).

C. Stabilité des complexes en solutions aqueuses : constantes de formation

1. Introduction

D'un point de vue analytique, la formation de complexes présente de multiples intérêts en analyse chimique. Par exemple, en analyse qualitative elle permet :
- la caractérisation d'ions par formation de complexes colorés,
- la solubilisation de sels peu solubles,
- la dissimulation d'ions gênants par masquage.

En analyse quantitative citons les titrages impliquant une ou plusieurs réactions de complexation.
Si l'on considère, par exemple, le masquage des ions, c'est un fait expérimental que dans certains complexes les ions constitutifs sont dissimulés à la presque totalité de leurs réactifs habituels. Ce sont les *complexes parfaits*, les autres étant dits *imparfaits*. Entre les deux types, existe naturellement toute la gradation. Par exemple, l'ion hexacyanoferrate (ferricyanure) $[Fe(CN)_6]^{3-}$ est considéré comme parfait. La plupart des réactions de l'ion $Fe^{3+}(aq)$ sont négatives. Il en est de même de :

On vérifie immédiatement que

$$\beta_n = K_1 \times K_2 \times \ldots \times K_n$$

ou

$$\beta_n = \prod_{i=1}^{i=n} K_i$$

Ces constantes sont exprimées ici en termes d'activités. Ce sont donc des constantes thermodynamiques qui ne dépendent que de la température (et du choix des états standard). Usuellement, mais pas obligatoirement, les constantes de formation successives décroissent régulièrement et légèrement. C'est ainsi le cas par exemple du système Cd^{II}/NH_3 où l'on trouve pour les différents *autocomplexes* [27].

$$Cd^{2+}(aq) + NH_3(aq) \rightleftharpoons [Cd(NH_3)]^{2+}(aq) \quad K_1 = 10^{2,65}$$

$$[Cd(NH_3)]^{2+}(aq) + NH_3(aq) \rightleftharpoons [Cd(NH_3)_2]^{2+}(aq) \quad K_2 = 10^{2,10}$$

$$[Cd(NH_3)_2]^{2+}(aq) + NH_3 \rightleftharpoons [Cd(NH_3)_3]^{2+}(aq) \quad K_3 = 10^{1,44}$$

$$[Cd(NH_3)_3]^{2+}(aq) + NH_3(aq) \rightleftharpoons [Cd(NH_3)_4]^{2+}(aq) \quad K_4 = 10^{0,93}$$

D'autres exemples pourraient être fournis. Ce phénomène semble être dû à plusieurs facteurs qui agiraient simultanément comme les *facteurs statistiques* liés au nombre de sites de l'ion métallique restants à substituer par le ligand, les *facteurs stériques* liés au fait que l'encombrement stérique des complexes augmente avec le nombre de ligands déjà fixés et éventuellement les *facteurs électrostatiques* lorsque les ligands sont chargés.

D'un point de vue quantitatif :

- *la connaissance des constantes de stabilité permet de calculer les concentrations des différentes espèces présentes dans le milieu à l'équilibre.* Considérons l'exemple des autocomplexes formés par l'ion mercurique avec les ions chlorures

$$Hg^{2+}(aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons [HgCl^+](aq) \qquad K_1 = \frac{|HgCl^+|}{|Hg^{2+}||Cl^-|} = 10^{6,7}$$

$$[HgCl^+](aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons [HgCl_2](aq) \qquad K_2 = \frac{|HgCl_2|}{|HgCl^+||Cl^-|} = 10^{6,5}$$

$$[HgCl_2](aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons [HgCl_3^-](aq) \qquad K_3 = \frac{|HgCl_3^-|}{|HgCl_2||Cl^-|} = 10^{1}$$

$$[HgCl_3^-](aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons [HgCl_4^{2-}](aq)\,^{28} \qquad K_4 = \frac{|HgCl_4^{2-}|}{|HgCl_3^-||Cl^-|} = 10^{0,8}$$

Si on ajoute une solution d'ions mercuriques (nitrate) à une solution contenant des ions chlorures et si après équilibre il subsiste, par exemple, 10^{-4} mol.dm^{-3} d'ions chlorure libres, les constantes K_1 K_2 K_3 et K_4 précédentes permettent de cal-

27. Autocomplexes : complexes résultant d'équilibres successifs avec le même ligand.
28. Il convient de bien distinguer ici l'écriture entre crochets dans les équilibres qui ne signifie pas une concentration (ni une activité) qui est très utilisée pour bien distinguer une espèce complexe et les parenthèses dans les expressions des constantes d'équilibre indiquant des activités.

culer que les concentrations des espèces Hg^{2+}, $HgCl^{+}$, $HgCl_2$, $HgCl^{3-}$ et $HgCl_4^{2-}$ sont respectivement proportionnelles aux nombres 1, $10^{2,7}$, $10^{5,2}$, $10^{2,2}$, 10^{-1}. Ce sont des calculs de ce type qui permettent de justifier la position du point équivalent dans la méthode de Votocek-Dubsky qui se situe sensiblement après addition d'un équivalent d'ions Hg^{2+} pour deux équivalents d'ions Cl^-.

- la connaissance des constantes de stabilité permet de prévoir *les réactions entre complexes.*

Soit par exemple la formation des deux complexes diamminés

$$Ag^+(aq) + 2\,NH_3(aq) \rightleftharpoons [Ag(NH_3)_2]^+(aq) \qquad \beta_2 = 10^{+7,2}$$

$$Hg^{2+}(aq) + 2\,NH_3(aq) \rightleftharpoons [Hg(NH_3)_2]^{2+}(aq) \qquad \beta'_2 = 10^{+7,5}$$

La réaction d'échange

$$[Ag(NH_3)_2]^+(aq) + Hg^{2+}(aq) \rightleftharpoons [Hg(NH_3)_2]^{2+}(aq) + Ag^+(aq) \quad (36)$$

est possible. En effet la constante d'équilibre K, définie par l'expression

$$K = \frac{|Hg(NH_3)_2^{2+}||Ag^+|}{|Hg^{2+}||Ag(NH_3)_2^+|}$$

$K = \beta'_2/\beta_2$

$K = 10^{10,3}$

ou$K = 10^{p\beta 2} - 10^{p\beta' 2}$

La réaction (36) est donc thermodynamiquement possible. Elle est semblable à la réaction acide-base

$$HA_1 + A_2^- \rightleftharpoons HA_2 + A_1^-$$

Dans ce dernier cas, c'est un proton qui est échangé, dans le premier c'est le ligand. Cette similitude a amené certains auteurs (Charlot) à définir les complexes comme des donneurs de particules suivant l'équation

$$\underset{\text{(complexe)}}{\text{donneur}} \rightleftharpoons \underset{\text{(complexant)}}{\text{accepteur}} + \underset{\text{particule}}{p} \quad (37)$$

p est une particule quelconque neutre comme l'ammoniac ou un ion, comme dans la réaction (38)

$$[HgCl_2](aq) \rightleftharpoons [HgCl]^-(aq) + Cl^-(aq) \quad (38)$$

Les cas particuliers $p = H^+$ et $p = e$ correspondent aux phénomènes acide-base et redox.

Ils sont étudiés séparément. L'avantage de cette écriture est évidemment le rapprochement des réactions de complexation et des réactions acide-base ou redox permettant des raisonnements analogues et l'utilisation de formules également analogues. Dans ces conditions :

- les équilibres (37) et (38) sont des demi-réactions de complexation correspondant aux demi-réactions acide-base et redox

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

$$red \rightleftharpoons ox + e$$

Selon cette théorie, l'ionisation d'un complexe est considérée comme une compétition entre le complexe et le solvant pour la particule échangée. Par exemple, l'ionisation du chlorure mercurique dans l'eau (en réalité très faible) que l'on écrit :

$$[HgCl_2](aq) \rightleftharpoons [HgCl]^+(aq) + Cl^-(aq)$$

s'écrit aussi d'une façon équivalente

$$[HgCl_2](aq) + nH_2O \rightleftharpoons [HgCl]^+(aq) + Cl^-(nH_2O)$$

peut être considérée comme résultant de la superposition des deux demi-équilibres de complexation

$$[HgCl_2](aq) \rightleftharpoons [HgCl]^+(aq) + Cl^-$$

$$Cl^- + nH_2O \rightleftharpoons Cl^-(nH_2O)$$

- on peut définir une constante χ analogue au K_a des acides et des bases. Pour reprendre l'exemple du chlorure mercurique, on peut écrire par analogie avec l'équilibre

$$HA(aq) + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+(aq) + A^-(aq)$$

$$[HgCl_2](aq) + H_2O \rightleftharpoons [HgCl]^+(aq) + Cl^-(aq)$$

avec $$\chi = \frac{|HgCl^+||Cl^-|}{|HgCl_2|}$$

On vérifie immédiatement que

$$\chi = 1/K_2$$

Une telle écriture permet de poser la relation

$$pX = px - \log\frac{|donneur|}{|accepteur|}$$

avec : $\chi = -\log(Cl^-)$ avec Cl^- particule échangée

analogue à $$pH = pK_A - \log\frac{|acide|}{|base|}$$

Ces relations permettent de prévoir quantitativement la formation des complexes, de tracer les échelles correspondant à différentes particules et d'en déduire les domaines de prédominance des différents complexes successifs.

Un point de cette théorie à souligner est que les ligands (particules) se solvatent sans stabilité particulière, ce qui n'est pas le cas du proton et de l'électron. Il est donc moins justifié de traiter les phénomènes de complexation comme résultants de l'échange de particules que les phénomènes redox ou acide-base comme résultants d'un échange d'électrons ou de protons.

Il convient cependant de nuancer fortement les aspects prévisionnels que nous venons de développer en soulignant le fait que les constantes utilisées dans les calculs précédents sont les constantes thermodynamiques, valables à dilution infinie. De plus, nous avons implicitement supposé qu'il n'y a pas d'équilibres supplémentaires en solution. En conséquence, les résultats prévus de la sorte ne sont pas réalistes. Un moyen commode pour obtenir des prévisions réalistes est d'utiliser les

constantes conditionnelles. Mais avant de les définir, il est intéressant de rappeler quelques facteurs autres que structuraux influençant la formation de complexes.

3. Facteurs influençant la formation des complexes

Nous ne pouvons envisager ici tous les facteurs influençant la formation des complexes. Nous nous bornons à l'influence du pH, de la solubilité et d'une autre complexation.

a) Le pH

Le pH intervient à deux niveaux principaux, celui du ligand et celui du métal.

■ *Au niveau du ligand*

Nous avons vu que les ligands possèdent un doublet électronique. Ils possèdent un pouvoir nucléophile certain puisqu'ils donnent lieu à la formation de complexes. Or, usuellement, les espèces nucléophiles ont un comportement basique. La plupart des ligands sont donc des bases, et en se protonant, ils perdent leur pouvoir complexant. *A priori*, ces phénomènes se produisent principalement en zone acide mais dans le cas de bases suffisamment fortes, ils peuvent se manifester à des pH plus élevés. *La règle générale* est donc :
l'abaissement du pH diminue la stabilité des complexes dont le ligand est la base conjuguée d'un acide faible. Cette diminution est d'autant plus marquée que le pH est plus faible. Par contre, le pH n'a aucune influence sur les complexes dont le ligand est la base conjuguée d'un acide fort (Cl^-, Br^-, I^-) [29]. À titre d'exemple, on peut envisager la formation du complexe fluorofer III Fe F^{2+} selon

$$Fe^{3+}(aq) + F^-(aq) \rightleftharpoons [Fe\,F]^{2+}(aq)$$

puisque l'ion fluorure a un caractère basique

$$HF(aq) \rightleftharpoons F^-(aq) + H^+(aq)$$

la superposition des deux équilibres

$$Fe^{3+}(aq) + HF(aq) \rightleftharpoons [Fe\,F]^{2+}(aq) + H^+(aq)$$

montre que plus le milieu est acide, plus le complexe se dissout.

■ *Au niveau du métal*

Suivant le pH, les métaux peuvent subir le phénomène d'hydrolyse, avec formation d'hydroxydes. Par exemple pour l'ion aluminium

$$Al\,(H_2O)_6^{\;3+} + H_2O \rightleftharpoons Al(H_2O)_5OH^{2+} + H_3O^+$$

Ces réactions d'hydrolyse entraînent la formation d'hydroxydes métalliques. Ces réactions sont parfois considérées comme des réactions de complexation avec le ligand OH^-. Évidemment, ces réactions sont sous l'influence du pH. Les réactions d'hydrolyse entraînent parfois des complications considérables, car elles s'accompagnent souvent de précipitation d'oxydes, de formation de complexes basiques, de composés polynucléaires, phénomènes qui sont difficiles à chiffrer d'autant plus que leurs cinétiques peuvent s'avérer lentes.

---

29. Étant entendu que dans le cadre de cet alinéa le pH n'intervient qu'au niveau du ligand.

b) La solubilité

L'interférence phénomène de complexation – phénomène de solubilité peut être importante. Elle est mise à profit en analyse chimique – Considérons la dissociation du complexe argentodiammine $Ag(NH_3)_2^+$

$$[Ag(NH_3)_2]^+ (aq) \rightleftharpoons Ag^+(aq) + 2NH_3(aq) \qquad (39)$$

avec $\dfrac{|Ag^+||NH_3|^2}{|Ag(NH_3)_2^+|} = \dfrac{1}{\beta_2} \qquad \dfrac{1}{\beta_2} = 10^{-7}$

et la précipitation du chlorure d'argent

$$Ag^+(aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons Ag\,Cl \qquad (40)$$

avec $(Ag^+)\,(Cl^-) = Ks$

$$Ks = 10^{-9,7}$$

La coexistence des deux équilibres (39) et (40) permet d'écrire l'équilibre global

$$[Ag(NH_3)_2]^+ (aq) + Cl^-(aq) \rightleftharpoons AgCl\downarrow + 2NH_3(aq)$$

On en déduit que l'addition d'ions chlorures à la solution du complexe entraîne sa dissociation. Réciproquement, on peut dissoudre du chlorure d'argent par addition d'ammoniaque par formation du complexe argentodiammine. Il existe des cas particuliers dans lesquels le ligand ajouté pour dissoudre le précipité est le même que l'anion du sel insoluble. Par exemple, le chlorure cuivreux en milieu chlorhydrique est plus soluble que dans l'eau par formation des ions complexes $CuCl_2^-$ et $CuCl_3^{2-}$.

c) Autre complexation

L'existence d'un autre phénomène de complexation que celui envisagé se rencontre souvent pour des raisons pratiques. En effet, dans certains cas, pour pouvoir réaliser quantitativement la réaction de complexation désirée il faut se placer à un pH judicieux. C'est notamment le cas avec l'EDTA (cf. ci-après, Les chélates) avec lequel il est souvent nécessaire de travailler en milieu basique. Il faut donc tamponner le milieu notamment par le tampon ammoniacal. Il en résulte la possibilité de formation de complexes amminés avec l'ion métallique. C'est le cas par exemple avec Ni^{2+} et Zn^{2+} pour lesquels il se forme les complexes

$[Ni(NH_3)]^{2+}(aq)$, $Ni(NH_3)_2]^{2+}(aq)$,…………… $[Ni(NH_3)_6]^{2+}(aq)$
et $[Zn(NH_3)]^{2+}(aq)$, $[Zn(NH_3)_2]^{2+}(aq)$,………….. $[Zn(NH_3)_4]^{2+}(aq)$

La conséquence est que les ions métalliques engagés dans ces complexes secondaires ne participent pas à la formation du complexe désiré.

4. Constantes conditionnelles de stabilité

a) Problème du chiffrage des concentrations des différences espèces après équilibre de complexation

Lorsqu'on cherche à former un complexe ML à partir d'un ion métallique M et d'un ligand L selon la réaction,

La constante conditionnelle de stabilité K' est définie par l'expression

$$K' = \frac{[N_iY^{2-}]}{[N_i'][Y']} \quad (46)$$

Plus généralement, pour la formation d'un complexe Mln suivant l'équilibre global

$$M + nl \rightleftharpoons Ml_n$$

la constante conditionnelle de stabilité est définie par l'expression

$$K'_{MLn} = \frac{[MLn]}{[M'][L']^n}$$

avec [M']: somme des concentrations des espèces comprenant le métal, excepté le complexe.
[L']: somme des concentrations des espèces comprenant le ligand, excepté le complexe.

Nous allons voir que les constantes conditionnelles de stabilité tiennent compte des équilibres parasites et sont aisées à calculer.

c) Calcul des constantes conditionnelles de stabilité

En introduisant les constantes successives $K_1 \ldots K_6$ de stabilité des complexes amminés dans l'expression de [Ni'] (44) on trouve

$$[Ni'] = [Ni^{2+}]\ [1 + [NH_3]\ K_1 + \ldots\ldots [NH_3]_6\ K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6]$$

et de même en introduisant dans (45) les constantes d'acidité successives de l'EDTA

$$[Y'] = [Y^{4-}]\left[1 + \frac{[H^+]}{K_{a_4}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a_4}K_{a_3}} + \ldots + \frac{[H^+]^4}{K_{a_4}K_{a_3}K_{a_2}K_{a_1}}\right] \quad (34)$$

Les paramètres α_{Ni} et α_Y définis par

$$\alpha_{Ni} = 1 + [NH_3]\ K_1 + \ldots\ [NH_3]^6\ K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6$$

et

$$\alpha_Y = 1 + \frac{[H^+]}{K_{a_4}} + \ldots + \frac{[H^+]^4}{K_{a_4}K_{a_3}K_{a_2}K_{a_1}}$$

sont obligatoirement supérieurs à 1.

La comparaison de l'expression (46), avec l'expression de la constante thermodynamique donne immédiatement

$$K' = \frac{K}{\alpha_Y \alpha_{Ni}}$$

ou

$$\log K' = \log K - \log\alpha_{Ni} - \log\alpha_Y \quad (47)$$

Cette expression montre que la constante conditionnelle est obligatoirement inférieure à la constante thermodynamique. Elle montre, en outre, que K' est facilement calculable à partir de K. En effet, α_{Ni} ne dépend que de la concentration en ammoniac, (à partir du moment où l'on a déterminé une fois pour toutes les constantes $K_1\ K_2\ K_3\ K_4\ K_5$). En opérant avec un excès de tampon par rapport à l'ion

E. Les chélates

Nous avons déjà rappelé brièvement précédemment (considérations générales et terminologie). la définition des chélates. La caractéristique principale des chélates est leur très grande stabilité. Un chélate est considérablement plus stable que le complexe métallique bâti à partir du même ion métallique central et à partir de ligands monodentates de basicité proche de celle du chélateur. Deux très bons exemples de ces considérations sont les valeurs des constantes de stabilité de l'ion complexe $[Ni(NH_3)_6]^{2+}$ et le chélate $[Ni(en)_3]^{2+}$ (en : éthylènediamine) (*fig. 11*).

Les valeurs des constantes respectives $\beta_6 = 3{,}1 \cdot 10^8$ et $\beta_3 = 10^{18}$ ne sont même pas comparables. Cette grande différence de stabilité est appelée *effet chélate*.

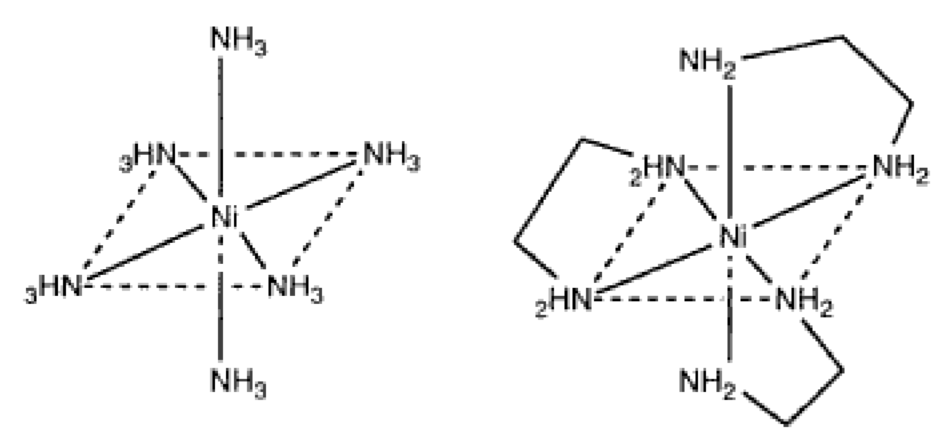


Figure 11. Structures et constantes de stabilité globales des ions $[Ni(NH_3)_6]^{2+}$ et $[Ni(en)_3]^{2+}$

Schwartzenbach a dégagé des règles empiriques de stabilité des chélates :

- le rapport nombre de moles de chélateur/nombre d'ions coordinateurs. La valeur 1 est optimale ;
- le nombre de cycles pentagonaux dans lequel le métal se trouve engagé. La stabilité du chélate est d'autant plus grande que ce nombre est lui-même plus grand. Dans le complexe $[Ni\ (en)_3]^{2+}$ il y en a trois ;
- la nature des atomes donneurs. L'oxygène et l'azote conduisent aux chélates les plus stables.

Le chélate formé à partir du complexon IV représentée sur la figure 12 souscrit, au mieux, à toutes ces exigences. Notons que dans ce chélate, le complexon IV est hexadentate.

L'origine de l'effet chélate est *entropique*. Considérons, à titre d'exemple, les réactions de formation des complexes $[Cd(NH_2CH_3)_4]^{2+}$ et du chélate $[Cd(en)_2]^{2+}$ (remarquer que la méthylamine et l'éthylènediamine ont une basicité comparable).

$$Cd^{2+}\,(aq) + 4\,CH_3NH_2(aq) \rightleftharpoons [Cd\,(NH_2CH_3)_4]^{2+}\,(aq)\ (\log\beta_4 = 6{,}52)\ (48)$$

$$Cd^{2+}\,(aq) + 2\,NH_2CH_2CH_2NH_2\,(aq) \rightleftharpoons [Cd\,(en)_2]^{2+}\,(aq)\ (\log\beta 2 = 10{,}6)\ (49)$$

Les constantes de stabilité β_4 et β_2 sont reliées aux enthalpies libres standard de ces réactions $\Delta G°$ par la relation générale :

$$\Delta G° = -\,RT \ln \beta$$

de la formation du chélate, d'un plus grand nombre de molécules d'eau (usuellement 6) que celui de molécules de chélateur liées (puisque par définition un chélateur est au moins bidentate). Il en résulte un plus grand désordre de l'ensemble du système thermodynamique considéré (constitué par l'ensemble : ion métallique plus molécules de chélation *plus molécules de solvant*).

La formation de chélates avec les complexons II (ou IV) (le premier étant le sel disodique du tétracide) obéit aux mêmes considérations que celles développées précédemment. Rappelons, en effet, que l'EDTA-YH_4 est un tétracide dont les constantes d'ionisation sont données ci-dessous :

$$YH_4(aq) + H_2O \rightleftharpoons YH_3^- \,(aq) + H_3O^+ \,(aq) \quad K_a = 10^{-2,0}$$
$$YH_3^- \,(aq) + H_2O \rightleftharpoons YH_2^{2-} (aq) + H_3O \,(aq) \quad K_a = 10^{-2,7}$$
$$YH_2^{2-} (aq) + H_2O \rightleftharpoons YH^{3-} \,(aq) + H_3O^+ \,(aq) \quad K_a = 10^{-6,2}$$
$$YH^{3-}(aq) + H_2O \rightleftharpoons Y^{4-} \,(aq) + H_3O^+ \,(aq) \quad K_a = 10^{-10,3} \quad (50)$$

Les considérations générales concernant la formation de complexes développées ci-dessus sont applicables à la formation de complexonates. Nous nous bornons à en donner ici trois exemples :

- le pH est un facteur important puisque le sel tétrasodique (ou les différentes formes acido-basiques intermédiaires, exceptée YH_4) sont des bases en vertu des équilibres (50).

Si l'on considère la réaction de formation d'un complexonate selon

$$M^{n+} + Y^{4-} \rightleftharpoons [MY]^{(n-4)+}$$

et si l'on considère la protonation des espèces Y^{4-}, YH^{3-}, YH^{2-}, YH^- selon les équilibres (50), il est évident qu'un milieu acide favorise la dissociation de ces chélates. En d'autres termes, ce sont seulement les ions métalliques qui donnent les chélates les plus stables qui sont complexés en milieu acide. D'une façon générale, ce sont les ions métalliques les plus chargés (Zr^{4+} , Hf^{4+} , Th^{4+} , Fe^{3+} , etc.). Par contre, le magnésium et les métaux alcalino-terreux ne peuvent être complexés quantitativement qu'à des pH basiques. Il est intéressant, à ce propos, de considérer les valeurs des constantes de stabilité de formation du chélate $[Mg\,Y]^{2-}$. Si l'on considère que l'ion Mg^{2+} n'est pas engagé dans d'autres processus que celui de formation du complexe et que la seule réaction parasite est celle de protonation des différentes formes basiques de l'EDTA, on peut écrire très généralement, d'après ce qui précède

$$\log K' = \log K - \log\alpha_Y - \log\alpha_M$$

et puisque $$\alpha_M = 1$$

$$\log K' = \log K - \log\alpha_Y$$

D'après les tables de données thermodynamiques $\log K = 8,7$

$$\text{A pH} = 5 \quad \log\alpha_Y = 7,0$$

$$\text{A pH} = 10 \quad \log\alpha_Y = 1,0$$

Il en résulte que le *titrage est tout à fait convenable* à pH = 10 puisque $\log K' = 7,7$. *Ce n'est pas le cas* à pH = 5 pour lequel la formation de chélate est très faible, puis-

que logK' = 1,7. Il convient de noter, à travers cet exemple, les variations très importantes des constantes conditionnelles de stabilité avec le pH.

- •Les constantes conditionnelles de stabilité permettent aussi de rationaliser le choix d'indicateurs colorés de métaux. Par exemple, lors du titrage direct d'un ion métallique par l'EDTA, en présence d'un indicateur coloré, le métal est initialement sous forme de complexe avec l'indicateur. Au fur et à mesure du titrage, le métal se trouve déplacé de son complexe avec l'indicateur pour être complexé par l'EDTA. Ceci signifie que dans les conditions du titrage, la constante de stabilité conditionnelle du complexe métal – EDTA doit être supérieure à celle du complexe métal-indicateur [31].
- •Enfin, la formation de complexonates peut être également sous la dépendance de facteurs cinétiques. Par exemple, il est tout à fait possible de titrer séquentiellement par l'EDTA un mélange de Cr^{III} et de Fe^{3+}. La réussite de ce titrage ne peut pas s'interpréter en termes de stabilité des complexes correspondants puisque les constantes de stabilité thermodynamique sont sensiblement égales. Le pH ne change en rien la différence de stabilité qui reste la même pour les constantes conditionnelles. Il s'agit donc là d'un facteur cinétique où il est mis à profit l'inertie des complexes de Cr^{III} que nous avons déjà mentionnée.

F. Composés éther-couronne et agents cryptants

La chimie des complexes s'est enrichie depuis une vingtaine d'années de nouveaux types de ligands très intéressants du point de vue théorique et pratique. Nous ne mentionnerons ici que très brièvement les composés éther-couronne (ou couronne) et les cryptants ou cryptates.

Les composés couronne sont des polyéthers macrocyliques. Deux exemples de composés couronne (avec leur nomenclature) sont donnés *(fig. 13)* : (15 (ou 18) est le nombre de maillons du cycle, 5 (ou 6) celui d'atomes d'oxygène, C signifiant Crown (couronne).

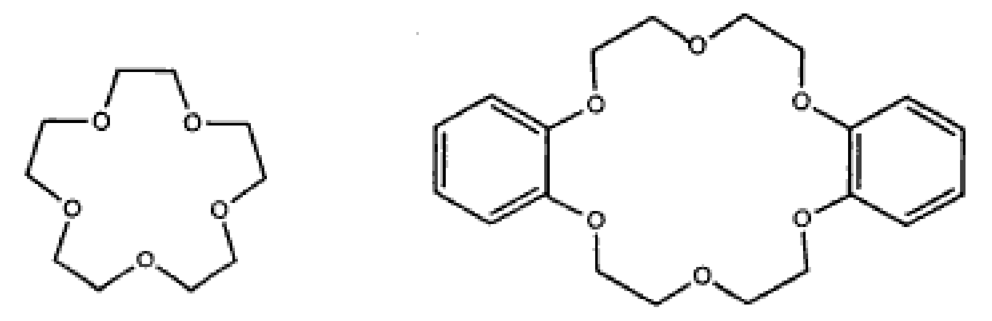


Figure 13. Exemples de deux composés couronne.

De nombreux autres composés couronne sont connus. Ce sont tous des composés préparés par synthèse. Les composés couronne donnent des complexes très stables notamment avec les ions alcalins et alcalino-terreux (Rappelons que les ions alcalins ne sont pratiquement pas complexés par l'EDTA).

31. Rappelons, à ce propos, que les indicateurs colorés d'ions métalliques sont eux-mêmes des composés chélatants.

Les *cryptants* ou *cryptates* sont des composés *bicycliques* dont la plupart possède la formule générale donnée *(fig. 14)* :

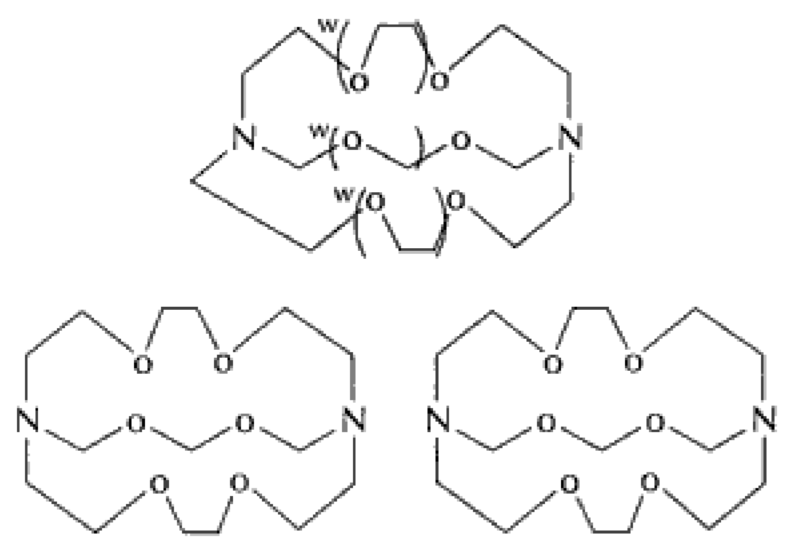


Figure 14. Formule générale des cryptates et formule du cryptate 2 2 2.

Ils diffèrent par le nombre d'atomes d'oxygène dans chacune des portions de cycles.

Ces deux types de ligands sont particulièrement intéressants pour les deux raisons suivantes :

- ils sont hautement polydentates ce qui confère à leurs complexes une grande stabilité thermodynamique, se traduisant par des valeurs élevées des constantes de formation ;
- ils sont sélectifs de certains ions, eu égard à la présence dans leur structure d'une cavité qui peut être occupée au mieux par un ion donné et non pas par un autre. La synthèse de cryptants ou de composés couronne a même été programmée dans le but de complexer sélectivement certaines espèces. Par exemple, on trouve comme constantes de stabilité (milieu méthanol – eau 95-5)
  - avec le cryptate – 2 2 2

$$\log K_{Na+} = 7 \qquad \log K_{K+} = 5$$

  - avec le cryptate – 2 2 1

$$\log K_{Na+} = 8{,}7 \qquad \log K_{K+} = 7$$

Signalons, enfin, qu'il existe des composés naturels comme la valinomycine qui sont sélectifs aux ions Na^+/K^+ et qui permettent le transport de ces ions à travers les membranes cellulaires. La sélectivité de ces composés et la stabilité des complexes qu'ils forment ont la même origine que les ligands précédents.

L'essentiel de la question

Les ions en solution aqueuse donnent lieu à différents types d'équilibres qui sont tous d'intérêt analytique. Ce sont les équilibres acide-base, les équilibres de formation des complexes, les équilibres redox et les équilibres de précipitation. Seuls les deux premiers sont envisagés dans ce chapitre.
La manipulation des équilibres ioniques en solutions impose la connaissance de quelques principes de thermodynamique chimique en rapport avec la composition de celles-ci et aussi la connaissance de l'état des ions. Ce qui conduit tout droit au concept d'activité et aux équations de Debye et Hückel. Les équilibres acide-base sont étudiés après un rappel de leur définition. La prévision des phénomènes acide-base est donnée. Elle est indissociable de la notion de pKa. Le pH qui est un concept posé par définition en termes d'activités est introduit ensuite avec les solutions tampons. L'extension aux fonctions de Hammett qui permettent de chiffrer l'acidité ou la basicité de solutions concentrée est également donnée.
Des considérations sur la définition et la formation de complexes sont évoquées enfin. Leur formation est traitée dans le même état d'esprit que le sont les équilibres acides-bases, c'est-à-dire d'après les mêmes principes thermodynamiques.

Pour en savoir plus

- Atkins P. W. *Physical chemistry*, 4e éd. Oxford University Press, 1990.
- Bates R. G. *Determination of pH : theory and practice*. New York, John Wiley and Sons, 1973.
- Bell R. P. *The proton in chemistry*. London, Methuen and Co, 1959.
- Bernard M. *Cours de chimie minérale*. Paris, Dunod, 1990.
- Burgot J.-L. A new point of view on the meaning and on the values of Ka°(H3O+,H2O) and Kb°(H2O, OH) pairs in water. The analyst 1998 ; 123 (2) : 409.
- Bockris J. O'M, Reddy A.K.N. *Modern electrochemistry*, tome I. New York, Plenum Press, 1970.
- Butler J. N. *Ionic equilibrium a mathematical approach*. Menlo Park, Addison-Wesley publishing company Inc, 1964.
- Charlot G. *Chimie analytique quantitative*. Paris, Masson, 1974.
- Cotton F. A., Wilkinson G. *Advanced inorganic chemistry*, 5e éd. New York, John Wiley and Sons, 1988.
- IUPAC. *Compendium of analytical nomenclature*. Oxford, Blackwell press, 1993.
- Ringbom A. *Les Complexes en chimie analytique*. Dunod, Paris, 1967.
- Rochester C. H. *Acidity functions*. London, Academic press, 1970.
- Société chimique de France. Manuel des symboles et de terminologie des grandeurs et des unités physico-chimiques (Union internationale de chimie pure et appliquée). Actualité chimique 1982 ; 9 (supplt).
- Tremillon B. *La Chimie en solvants non aqueux*. Paris, Presses universitaires de France, 1971.

Titrages en milieux non aqueux

G. BURGOT, J.-L. BURGOT
Laboratoire de chimie analytique, Faculté de pharmacie, Rennes.

L'utilisation des milieux non aqueux se justifie par l'impossibilité de réaliser certains titrages en milieu aqueux. Cette méthodologie est largement utilisée dans les pharmacopées. Après un rappel sur les propriétés des solvants les plus utilisés, nous soulignerons les insuffisances de l'eau. Nous envisagerons ensuite les concepts de pH et de pK_a en milieux non aqueux avant de terminer par quelques considérations pratiques et applications pharmaceutiques de cette méthodologie.

I. Classification des solvants

A. Solvants prototropiques

Il existe plusieurs classifications possibles des solvants. Nous nous bornons à rappeler ici qu'il existe :
- les solvants *donneurs de protons* appelés *protogènes* ou *acides* ;
- les solvants *accepteurs de protons* dits *protophiles* ou *basiques* ;
- les solvants à la fois *donneurs et « accepteurs »* de protons, dits *amphiprotiques* ou *amphiprotoniques*. Ils peuvent posséder une propriété protophile ou protogène dominante. On parle alors de :
  - solvants amphiprotiques acides (exemple : l'acide acétique) ;
  - solvants amphiprotiques basiques (exemple : l'ammoniaque).

Il est, en effet, très difficile de pouvoir trancher entre l'existence d'une propriété protophile ou protogène pure et celle d'une propriété amphiprotique basique ou acide. Par exemple, des traces d'eau dans un solvant qui n'est que protophile ou protogène lui confèrent apparemment une propriété amphiprotique.
Ces trois premiers types de solvant possèdent un caractère *prototropique* car ils participent aux échanges de protons.

B. Solvants aprotiques

Les solvants qui ne peuvent *ni donner ni accepter* de protons sont dits *inertes* ou *aprotiques*. Au sein de cette catégorie, on distingue parfois :
- les *solvants réellement inertes*, qui ne participent ni directement ni indirectement aux phénomènes acide-base (exemple : les hydrocarbures) ;
- les *solvants qui ne peuvent accepter ou donner des protons*, mais qui possèdent une permittivité relative ε_r (*constante diélectrique*) suffisamment *élevée* pour promouvoir une dissociation. Ce sont les solvants dipolaires aprotiques (exemples : nitrobenzène).

Il est possible, également, de classer ces solvants en fonction de leur caractère dissociant (permittivité relative élevée ou non), propriété qui sera plus longuement envisagée lors de l'étude approfondie de ces solvants.
Le *tableau 1* contient quelques exemples de ces différents solvants.

Tableau 1. Exemples de solvants utilisés en milieux non-aqueux et quelques-unes de leurs propriétés

Permittivité relative	Caractère acide	Caractère basique	Exemples (ε_r)
+	+	+	Eau (78,3)
+	+	–	Acide sulfurique (101)
+	–	+	Éthanolamine (37,7)
+	–	–	Acétonitrile (36,0)
–	+	+	Éthanol (24,3)
–	+	±	Acide acétique (6,1)
–	–	+	Pyridine (12,3)
–	–	–	Benzène (2,3)

II. Rôle joué par les solvants dans les réactions acide-base

La nature du solvant intervient à trois niveaux.

A. Pouvoir solvant ou pouvoir de dissolution

La dissolution est la dispersion du soluté à l'état d'ions ou de molécules parmi les molécules de solvant. Cette dissolution met en jeu plusieurs phénomènes :
- les uns dépendent de la substance à dissoudre ;
- les autres du solvant ; il n'existe pas de solvant universel, et la vieille maxime des apothicaires, « *Similia similibus solvantur* », est toujours vérifiée.

L'insertion de la substance à dissoudre s'accompagne de l'établissement d'interactions entre espèces du soluté et celles du solvant appelées « phénomènes de solvatation ». Après dissolution de la substance, la solution contient donc des molécules ou des ions solvatés.
- Les forces qui sont à l'origine des intéractions soluté-solvant sont soit :
- des interactions électrostatiques ion-dipôle ;
- des forces de Van der Waals ;
- des liaisons hydrogène.

B. Permittivité relative ε_r

Plus un solvant a une permittivité relative élevée, plus il est dissociant, c'est-à-dire que toute entité qui est ionisée en une paire d'ions voit celle-ci dissociée en ions séparés.

C. Pouvoir prototropique

Certains solvants sont aptes à céder ou capter un proton. Il suffit qu'ils trouvent dans le soluté un accepteur ou un donneur de protons plus forts qu'eux. Le solvant joue alors le rôle d'acide ou de base révélateur. On conçoit donc que le pouvoir

prototropique du solvant exalte ou atténue l'acidité du soluté, telle qu'elle se manifeste et non telle qu'elle est intrinsèquement. Ainsi le gaz chlorhydrique est-il un acide fort dans l'eau et un acide faible dans l'acide acétique, solvant jouant le rôle de base. Bien évidemment, l'espèce étudiée est la même (gaz chlorhydrique) et pourtant il se comporte soit comme un acide fort soit comme un acide faible.

$$HCl + H_2O \longrightarrow Cl^- + H3O^+ \qquad \text{Acide fort}$$

$$HCl + CH_3COOH \rightleftharpoons Cl^- + CH_3COOH_2^+ \qquad \text{Acide faible}$$

III. Insuffisances de l'eau

A. Mauvaise dissolution

L'eau est un très *mauvais solvant* des composés apolaires ou peu polaires (ce qui est le cas d'une grande majorité de substances pharmacologiquement actives non ionisées). On sait, par exemple, que les acides peu solubles dans l'eau, comme les acides gras, ne sont pas titrables directement dans ce milieu, non pas en raison de la faiblesse de leur fonction acide (du même ordre de grandeur que celle de l'acide acétique, pKa = 4,75, parfaitement titrable par l'hydroxyde de sodium en milieu aqueux), mais du fait de leur faible solubilité dans l'eau. On peut remédier à cet inconvénient en ajoutant un solvant organique miscible comme l'éthanol, le méthanol ou l'acétone.

B. Nivellements

L'eau provoque des nivellements. Elle est suffisamment basique pour entraîner une dissociation totale de certains acides qui ne sont alors plus titrables séquentiellement par protométrie. On dit qu'il y a nivellement de ces acides (exemple : $HClO_4$, HCl, HBr, HNO_3...). Du point de vue de l'acidité, ces solutions se comportent comme une solution d'ions H_3O^+.

$$HX + H_2O \longrightarrow X^- + H3O^+$$

Il y a, de même, nivellement de certaines bases dû au caractère acide de l'eau (exemple : ion amidure – NH_2^-, ion alcoolate $CH_3CH_2O^-$... qui sont nivelés au niveau de la base).

$$C_2H_5O^- + H_2O \longrightarrow C_2H_5OH + OH^-$$

C. Difficulté de différenciation

L'autoprotolyse, qui consiste en la réaction d'une molécule d'eau sur elle-même, entraîne le fait que le domaine d'acidité accessible ou échelle de pH est limité (sensiblement 0 à 14). C'est justement pour des pKa de solutés inférieurs à 0 et supérieurs à 14 qu'il y a nivellement. Expérimentalement, on a constaté que, pour

valeur de constante d'acidité Ka, il faut que le solvant soit amphiprotique ou protophile. Un solvant de ce type très utilisé est l'acide acétique.
Dans ces solvants, l'équilibre global de protolyse résulte de la superposition d'un *équilibre d'ionisation* qui conduit à la formation d'une paire d'ions selon

$$HA(s) + SH \rightleftharpoons A^- , SH_2^+ (s) \qquad (3)$$

avec $K_i = \dfrac{a_{SH_2^+, A^-}}{a_{HA} a_{SH}} = \dfrac{a_{SH_2^+, A^-}}{a_{HA}}$

$a_{SH} = 1$ pour les solutions diluées
et d'un *équilibre de dissociation* de la paire d'ions

$$A^- , SH^+_2(s) \rightleftharpoons A^-(s) + SH^+_2 (s) \qquad (4)$$

avec $K_{ass} = \dfrac{a_{SH_2^+, A^-}}{a_{A^-} a_{SH_2^+}}$

On définit une constante K_a globale de protolyse par la relation

$$K_a = \frac{a_{SH_2^+} a_{A^-}}{a_{HA} + a_{SH_2^+, A^-}} \qquad (5)$$

qui prend en compte les deux équilibres :

$$HA(s) + SH \rightleftharpoons A^- , SH^+_2(s) \rightleftharpoons A^-(s) + SH^+_2 (s) \qquad (6)$$

Le numérateur de l'expression (5) a la même signification que dans le cas d'un solvant dissociant. Le dénominateur est plus complexe. Il correspond à l'ensemble de l'acide non dissocié. Il est facile de montrer que

$$pK_a = \log K_{ass} + \log \left(1 + \frac{1}{K_i}\right)$$

L'expression de K_a tient compte à la fois du ε *via* K_{ass} et du pouvoir prototropique *via* K_i.
Cette relation montre que, même pour un acide totalement ionisé, le pKa possède une valeur finie ($pK_a = \log K_{ass}$), et finalement l'acide présente le même comportement qu'un acide faible dans l'eau. On pourrait de même définir un K_b global pour une base moléculaire. Les notions de K_a et K_b sont donc plus complexes dans les solvants amphiprotiques peu dissociants que dans les solvants dissociants.
Une même valeur de pH dans deux solvants différents ne correspond pas au même niveau d'acidité absolue. De même, deux couples acide-base ayant la même valeur de pKa dans deux solvants (analogues) ne sont pas de la même force.

3. Solvants inertes et mélanges de solvants

Les solvants inertes (benzène, chloroforme, tétrachlorure de carbone, peu employés du fait de leur toxicité), qui ne possèdent aucun caractère protophile ou protogène, ne solvatent pas le proton. On ne peut plus définir de constante K_a. Les réactions dans ces solvants sont de type moléculaire et il n'est plus possible de construire des échelles ioniques de pH. Ils sont surtout intéressants en mélange avec un solvant amphiprotique.

En effet : l'équilibre d'autoprotolyse :

• sans solvant inerte : $2SH \rightleftharpoons SH_2^+ + S^-$

avec : $K_S = \frac{a_{SH_2^+} a_{S^-}}{a^2_{SH}}$

$K_S a^2_{SH} = a_{SH_2^+} a_{S^-}$

or $a_{SH} = 1$ donc $K_S = a_{SH_2^+} a_{S^-}$

•avec un solvant inerte :

a_{SH} devient < 1car $n_T = n_{SH} + n_{soluté} + n_{solvant\ inerte}$

On définit $K_s' = K_s\, a^2_{SH}$

$K'_s < K_s$ donc $pK'_s > pK_s$

En conséquence, l'addition d'un solvant inerte favorise la mise en évidence du point d'équivalence en augmentant l'importance du saut de pH.

V. Propriétés de quelques solvants

A. Éthanol et méthanol

Ce sont des solvants moléculaires amphiprotiques analogues à l'eau.

CH_3OH $pK_{SH} = 16,7$ $\varepsilon_r = 32,6$

C_2H_5OH $pK_{SH} = 19,1$ $\varepsilon_r = 24,3$

Ces deux solvants présentent l'avantage d'avoir un domaine de pH accessible plus important que l'eau et d'être meilleurs solvants des solutés organiques. Par ailleurs, ils sont moins dissociants que l'eau, et si les solutions ne sont pas assez diluées la formation de paires d'ions ne peut pas être négligée. Ils permettent ainsi de réaliser des titrages séquentiels d'acide et notamment des titrages de bases protonées BH^+ qui deviennent suffisamment fortes.

B. Acide acétique

C'est un solvant moléculaire de faible permittivité relative ($\varepsilon = 6,2$) amphiprotique. Son produit ionique est de $10^{-14,5}$, mais le pH ne varie pas de 0 à 14,5 du fait de la formation de paires d'ions. Il varie sensiblement de 3,5 à 11.

L'intérêt de l'acide acétique est double :

- son bon pouvoir solvant des composés organiques et composés polaires hydroxylés ;
- son pouvoir prototropique. De par son acidité intrinsèque :
  - il *exalte la force de bases*. Ces dernières, qui sont très faibles dans l'eau et non titrables, sont suffisamment fortes pour être titrées dans l'acide acétique ;

exemple : les amides, les oximes. Cette propriété est souvent mise à profit pour titrer les alcaloïdes ou les bases des sels d'alcaloïdes ;

- il *diminue la force des acides dits forts dans l'eau.* Ainsi, dans l'acide acétique, les acides chlorhydrique et nitrique deviennent faibles. L'un des seuls acides forts qui subsiste est l'acide perchlorique, que l'on utilise d'ailleurs comme titrant.

C. Cétones et amines

Les cétones (acétone $\varepsilon = 20$, méthyl isobutylcétone $\varepsilon = 13{,}6$) et les amines (pyridine $\varepsilon = 12{,}3$ et butylamine $\varepsilon = 5{,}3$) sont des solvants protophiles et non protogènes qui ne donnent donc pas lieu à un équilibre d'autoprotolyse. Les acides y sont plus ou moins protolysés ; par contre, les bases potentielles ne sont pas protolysées.
Ces solvants sont utilisés pour titrer séquentiellement un mélange de plusieurs acides, en particulier les cétones moins protophiles que l'eau et donc moins susceptibles de niveler les acides.

D. Mélanges

Les mélanges (acide acétique et méthyléthylcétone, et acide formique et anhydride acétique) sont de plus en plus utilisés dans la Pharmacopée européenne. Outre l'argumentaire déjà développé ci-dessus, l'addition de méthyléthylcétone à l'acide acétique améliore les titrages en diminuant le produit ionique et donc en augmentant le saut de pH au point équivalent. L'addition d'anhydride acétique à l'acide formique (solvant dissociant) est également réalisée pour augmenter le saut de pH car l'échelle de pH dans l'acide formique est limitée ($pK_S = 5$). Enfin, d'un point de vue pratique, l'anhydride acétique est ajouté à l'acide acétique pour éliminer l'eau de cristallisation éventuelle du soluté et garder le caractère anhydre du solvant :

$$H_2O + (CH_3CO)_2O \longrightarrow 2\ CH_3COOH$$

VI. Aspects pratiques

A. Mise en évidence du point équivalent

Comme en milieu aqueux, le point équivalent est apprécié par utilisation d'indicateurs colorés ou le plus souvent par potentiométrie.

1. Indicateurs colorés

En principe, ceux utilisés en milieu aqueux sont utilisables en milieux non aqueux. Ces indicateurs étant des acides ou des bases faibles, il convient de faire un étalonnage de la position de leur virage sur l'échelle d'acidité par potentiométrie puisque celle-ci varie en fonction du solvant utilisé.

Citons :

- avec les solvants acides :
  - acide acétique : violet cristallisé ou α-naphtolbenzéine ;
  - acide acétique + acide formique : violet cristallisé ;
  - acide acétique + méthyléthylcétone : α-naphtolbenzéine ;
- avec les solvants basiques : bleu de thymol, thymolphtaléine ;
- avec l'alcool ou l'acétone : phénolphtaléine.

Ces indicateurs sont préparés en solution à 1 % dans le solvant utilisé. Un titrage à blanc en présence des solvants et du colorant est réalisé au préalable et le volume de titrant versé soustrait du volume obtenu lors du titrage.

2. Potentiométrie

On utilise un potentiomètre ou même un pHmètre en ne considérant que la graduation en millivolts car celle de pH n'a plus de signification puisqu'elle est établie pour le solvant eau. L'électrode indicatrice est celle de verre, qui convient très bien pour l'acide acétique et pour certains solvants basiques tels que la pyridine. Pour l'éthylène diamine et d'autres solvants basiques, on utilise l'électrode d'antimoine. L'électrode de référence est le plus souvent celle d'argent Ag/AgCl ou une électrode au calomel saturé Hg/Hg_2Cl_2. Une solution de chlorure de lithium dans l'acide acétique (solution saturée ou 1 M de ce sel) est utilisée comme liquide de jonction lors du titrage dans les solvants acides. Pour les solvants basiques, on utilise du chlorure de potassium dans le méthanol.
On peut procéder par enregistrement de la courbe mV/mL ou par tracé de la courbe dérivée comme le prescrit la Pharmacopée. Le point d'équivalence correspond au point d'inflexion de la courbe.

B. Solutions titrantes

1. Pour l'acide acétique anhydre

Il s'agit d'une solution d'acide perchlorique $HClO_4$ préparée par action de la solution aqueuse de ce dernier sur de l'anhydride acétique. Le titre est déterminé avec le carbonate acide de potassium $KHCO_3$ ou avec le phtalate acide de potassium :

COOH
COOK

L'acide perchlorique demeure un acide fort dans ce solvant.

2. Pour les solvants organiques basiques

Il s'agit de solution de méthylate de sodium, CH_3ONa, ou potassium, CH_3OK, préparée par action du métal alcalin sur la quantité minimale d'alcool. On dilue le tout par un solvant inerte comme le benzène ou le toluène. On utilise également l'hydroxyde de tétrabutyl ammonium $(C_4H_9)N^+OH^-$. Ces solutions titrantes sont peu stables et sensibles, en particulier à l'anhydride carbonique. Leur titre doit être contrôlé fréquemment. On utilise comme étalon l'acide benzoïque C_6H_5COOH.

L'ion pyridinium formé est titré par une solution éthanolique d'hydroxyde de sodium en présence de thymolphtaléine. L'avantage de cette technique est qu'elle remplace un titrage acide faible/base forte par une réaction acide fort/base forte puisque l'ion pyridinium $C_5H_5NH^+$ est l'acide le plus fort dans la pyridine. De plus, par son caractère accepteur de proton la pyridine rend la réaction complète.

C. Dosage des sels

1. Sels d'acides faibles

BH^+X^- avec X^- = propionates, maléates, benzoates, tartrates, citrates, panthothénates.

Ces sels X^- sont des bases faibles qui sont encore titrables par l'acide perchlorique en milieu acétique. Exemples : maléate de chlorphéniramine, citrate de clomifène, tartrate de dextromoramide, pantothénate de calcium.

Mais cette méthode n'est pas spécifique car c'est le sel X^- et non la base B, pharmacologiquement active, qui est titré.

2. Sels d'acides forts

a) Sels d'acides forts halogénés et de bases organiques $BH^+ X^-$ (avec le plus souvent $X^- = Cl^-$)

Dans ce cas, X^- est une base trop faible pour être titrée par l'acide perchlorique même en milieux non aqueux. Deux méthodes sont utilisées pour contourner cette difficulté. La plus ancienne, celle de Pifer et Wollish, consiste à ajouter de l'acétate mercurique à l'acide acétique. Dans ces conditions :

$$(CH_3COO)_2\,Hg + 2\,BH^+\,X^- \longrightarrow Hg\,X_2 + 2\,CH_3\,COO^-\,BH^+$$

L'ion acétate est la base la plus forte dans l'acide acétique, et le chlorure mercurique est un complexe stable non ionisé, il est donc possible de titrer les ions acétate libérés en quantité stoechiométrique à partir des halogénures présents. Exemples : chlorhydrate de chlordiazépoxide. Cette méthode est remplacée progressivement à chaque révision des monographies par la méthode de Billon en raison des contraintes réglementaires sur les déchets à base de mercure.

Billon propose un dosage dans l'éthanol après addition d'une petite quantité d'acide chlorhydrique de façon à protoner intégralement la base B si celle-ci n'est pas stoechiométriquement salifiée. L'éthanol permet une différenciation nette de la force des couples BH^+/B et HCl/Cl^- et l'on titre successivement l'excès de HCl puis la totalité de la base sous forme protonée. On trace la courbe potentiométrique au fur et à mesure de l'addition d'hydroxyde de sodium et on mesure le volume utilisé entre les deux points d'inflexion. Cette deuxième méthode plus spécifique, puisque dans ce cas c'est la partie organique qui est titrée, est de plus en plus utilisée dans les protocoles de la Pharmacopée européenne. Exemples : chlorhydrate de doxapram, chlorhydrate de maprotiline, chlorhydrate de chlorpromazine, chlorhydrate de vérapamil.

b) Sels de l'acide sulfurique et de bases organiques

■ ***Sulfates neutres (sulfate de salbutamol, sulfate d'atropine, sulfate de morphine, sulfate de terbutaline) : 2 RNH^+_3 , SO_4^{2-}***

$$2\ RNH_3^+\ SO_4^{2-} + CH_3COOH \longrightarrow RNH_3^+\ HSO_4^- + RNH_3^+\ CH_3COO^-$$

Dans l'acide acétique, l'ion HSO4⁻ a un caractère trop peu basique pour être dosé par l'acide perchlorique, et donc

$$RNH_3^+\ CH_3COO^- + HClO_4 \longrightarrow RNH_3^+\ ClO_4^- + CH_3COOH$$

Dans ce cas l'équivalent correspond au poids moléculaire. Le dosage n'est pas spécifique de la partie organique.

■ ***Sulfates basiques (sulfate basique de quinine, sulfate basique de quinidine)***

$$2\,R\begin{cases}N\\NH^+\end{cases},SO_4^{2-} + CH_3COOH \longrightarrow R\begin{cases}N\\NH^+HSO_4^-\end{cases} + R\begin{cases}N\\NH^+CH_3COO^-\end{cases}$$

$$\big\downarrow\ 3\ HClO_4$$

$$R\begin{cases}NH^+\ \ ClO_4^-\\NH^+\ HSO_4^-\end{cases} + R\begin{cases}NH^+\ ClO_4^-\\NH^+\ ClO_4^-\end{cases}$$

Dans ce cas, trois basicités sont titrées, l'ion sulfate et un azote basique par molécule. Le dosage est plus spécifique que le précédent.

Conclusion

Les titrages en milieux non aqueux constituent une alternative largement utilisée aux titrages en milieu aqueux pour le contrôle des matières premières pharmaceutiques. Leur exactitude et leur précision sont excellentes, et de plus ils sont automatisables à l'aide d'un titrateur automatique. Leur manque de spécificité commune avec les autres méthodes titrimétriques peut être compensée par une identification rigoureuse de l'échantillon.

Les méthodes d'analyses électrochimiques, principes et applications

G. VAN AMERONGEN
Laboratoire de biochimie, hôpital R. Poincaré, Garches,
et Laboratoire de chimie analytique, faculté de pharmacie, Paris XI.

I. Électrolyse

A. Tension de l'électrolyse
B. Loi de Faraday
C. Cinétique de la réaction
D. Prévisions des réactions électrochimiques : courbes intensité/potentiel
E. Limitation de la vitesse des réactions électrochimiques par le transfert des corps électrolysés vers l'électrode
F. Principe de la détermination des courbes intensité-potentiel = la voltampérométrie

II. Méthodes électrochimiques d'analyse

A. Les déterminations potentiométriques
B. Les déterminations ampérométriques
C. Électrodes à enzymes
D. Méthode ampérométrique avec une électrode indicatrice particulière (électrode à goutte de mercure) = polarographie

III. Titrages électrochimiques

A. Comment ajouter le réactif titrant en quantité progressive connue
B. Comment déterminer le point équivalent d'une réaction

IV. Détection électrochimique en chromatographie en phase liquide

A. Domaines d'application
B. Méthodes utilisées

Avant d'envisager les méthodes d'analyses électrochimiques, qui sont des méthodes de détection résultant de l'exploitation des courbes intensité-potentiel obtenues au cours de microélectrolyse, il faut définir :
- *ce que représente une réaction électrochimique ;*
- *comment on obtient une réaction électrochimique ;*
- *d'après le tracé des courbes i/E correspondant à une réaction électrochimique, comment on peut choisir une méthode pour analyser une espèce participant à cette réaction.*

Un processus électrochimique est constitué par l'ensemble des phénomènes associés à la production d'un transfert de charge électrique (électrons) à travers une interface. Cette interface résulte de la mise en contact d'un conducteur électronique (électrode) et d'un conducteur ionique (électrolyte).
Une réaction électrochimique représente la transformation chimique produite par le passage d'un courant électrique, correspondant au transfert de charges (électrons) à travers cette interface.
Si l'on considère une électrode (libre circulation des électrons) et un électrolyte, milieu dans lequel il n'existe pas d'électrons libres, le transfert d'électrons (e^-) de l'électrode à l'électrolyte nécessite la présence d'une substance, à proximité de l'interface, pouvant capter et fixer les e^- cédés par l'électrode :

$$ox + ne^- \Leftrightarrow red$$

Pour qu'un transfert ait lieu, de l'électrolyte à l'électrode, il doit exister à proximité de l'interface une substance pouvant donner des e^-

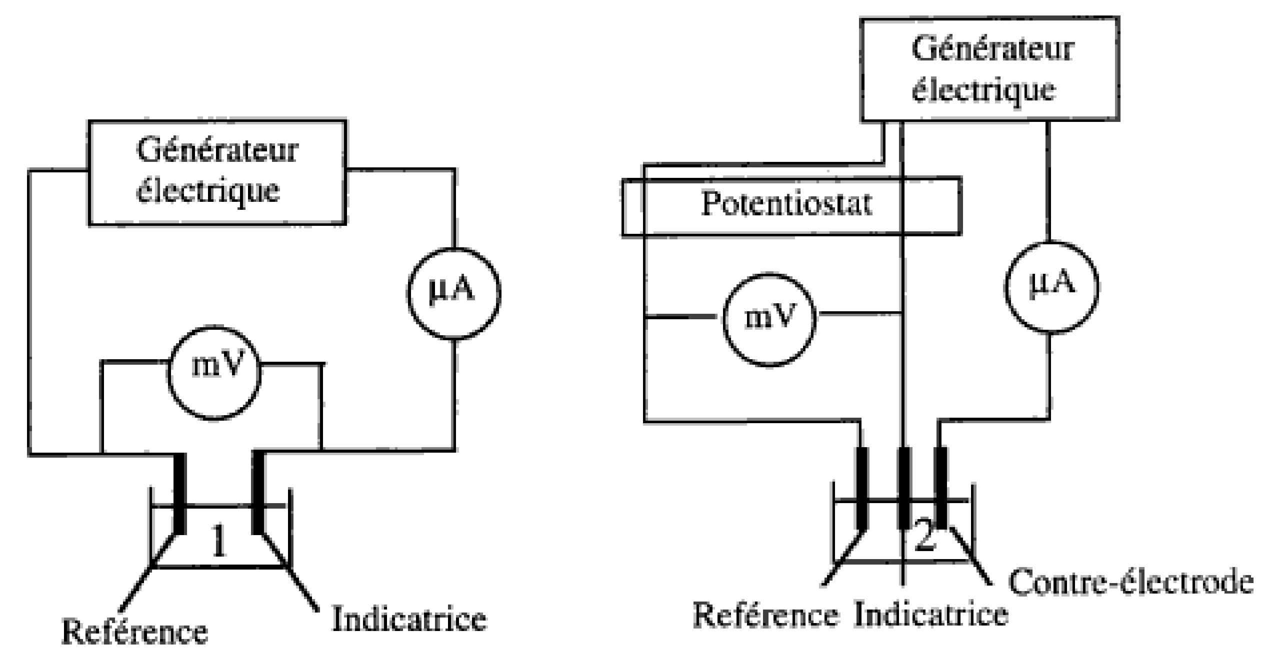
$$red - ne^- \Leftrightarrow ox$$

Cela se produit en solution, lors d'une opération appelée électrolyse.

I. Électrolyse

Pour effectuer une électrolyse, il faut réaliser le montage suivant (*fig. 1*) :
- une cellule d'électrolyse qui contient la solution à étudier ;
- un générateur électrique fournissant un courant continu ;
- des fils conducteurs reliés au générateur et terminés par deux électrodes plongeant dans la cellule d'électrolyse ;
- des appareils de mesure tels que voltmètre, galvanomètre.

Lorsque le circuit est fermé, il peut circuler un courant d'intensité i, le même à tout instant, en tout point du circuit.
Dans le circuit extérieur, générateur, fils conducteurs, électrodes, le courant est dû à la circulation des e^- libres.
Dans la solution (circuit interne) où les e^- libres n'existent pas, le passage du courant résulte de la migration des ions (électrolyte) sous l'influence du champ électrique créé entre les deux électrodes (transfert de charges).
Les cations migrent vers l'électrode négative (cathode), les anions vers l'électrode positive (anode) ; dans l'eau pure, il n'y aurait pas passage du courant.
S'il n'y avait pas un transfert entre circuit extérieur et circuit intérieur, c'est-à-dire à la surface des électrodes, il n'y aurait plus de courant. La continuité, donc le passage du courant, s'effectue par suite d'une transformation par oxydoréduction (échange d'e^-) que l'on désigne par réaction électrochimique.



1 = à 2 électrodes, référence et indicatrice
2 = à 3 électrodes, référence, indicatrice et contre-électrode

Figure 1. Schéma de montage voltampérométrique

Les deux électrodes d'un circuit d'électrolyse sont le siège de réactions électrochimiques d'effet contraire :

- à la cathode, les électrons passent dans le sens électrode vers solution et il y a réduction ;
- à l'anode, les électrons passent de la solution vers l'électrode, il y a donc oxydation.

Si le matériau même de l'électrode subit une transformation chimique en même temps qu'elle échange des e^-, on dit que l'électrode est attaquable, c'est-à-dire susceptible de s'oxyder ou de se réduire ; elle va participer à la réaction électrochimique. Les électrodes métalliques (sauf or et platine) sont des électrodes attaquables. L'or et le platine, métaux précieux car ils ne s'oxydent pas et ne se réduisent pas, sont des électrodes inattaquables.

Les corps pouvant subir une transformation par suite d'une réaction électrochimique sont dits électroactifs.

Dans certains cas, les deux électrodes peuvent être plongées dans la même cellule d'électrolyse mais très souvent, celle-ci est divisée en deux compartiments : l'un où plonge la cathode, l'autre où plonge l'anode.

On peut ainsi ne faire subir à une solution que des réactions de réduction si elle est dans le compartiment cathodique et, inversement, que des réactions d'oxydation en la plaçant dans le compartiment anodique. Le second compartiment doit alors recevoir une solution auxiliaire, qui subit elle aussi une électrolyse.

Si anode et cathode se trouvent dans des compartiments séparés, il faut les relier par une jonction qui doit permettre la migration des ions, tout en empêchant le mélange des solutions. On réalise la jonction avec un diaphragme poreux : verre fritté, membrane semi-perméable, pont d'agar-agar rendu conducteur par un électrolyte. La jonction entraîne toujours une résistance assez grande (chute ohmique notable) et une petite différence de potentiel (< 20 mV), dues au fait que les vitesses des ions à travers la jonction dépendent de leur nature et de leur concentration. Le potentiel de jonction sera d'autant plus faible que les ions de l'électrolyte auront des mobilités voisines.

A. Tension de l'électrolyse

La tension de l'électrolyse V comprend la différence de potentiel entre les deux électrodes (anode et cathode) plus la différence de potentiel due à la résistance interne de la cellule (loi d'Ohm) :

$$V = [Ea - Ec] + Ri$$

Ri représente la chute ohmique de tension dans le circuit.
Remarque : si R et i restent faibles, R < 1 000 ohms et i < 10 µA, la chute ohmique représente quelques mV et on peut la négliger.
Mais on a vu que s'il existe une jonction, la résistance devient importante, et on utilise alors un montage à 3 électrodes.

B. Loi de Faraday

Définition : les quantités (nombres de moles) des substances électroactives consommées ou produites à une électrode sont reliées à la charge électrique totale transférée à travers l'interface électrode-solution. Le courant d'électrolyse est dit faradique.

Pour un système $ox + ne^- \Leftrightarrow red$

par exemple $Na^+ + ne^- \Leftrightarrow Na^\circ$

il faut $1e^-$/atome soit $1{,}6.10^{-19}$ coulombs
soit pour 1 mole Q = NA (Avogadro) × e^-

$$Q = 6{,}02.10^{23} \times 1{,}6.10^{-19}\ C$$

$$Q = 96\cdot484 \text{ coulombs}$$

Cette charge électrique est également désignée par le terme de « faraday », F, le rapport Q/F est le nombre de faradays mis en jeu dans la réaction électrochimique.

La réaction $ox + ne^- \Leftrightarrow red$ ou $red - ne^- \Leftrightarrow ox$

nécessite l'échange à l'électrode de n faradays, par mole de ox et par mole de red (consommée ou produite).

C. Cinétique de la réaction

Le courant qui traverse l'interface électrochimique traduit à chacune des deux électrodes la vitesse du processus électrochimique, c'est-à-dire la vitesse de transformation de ox en red ou red en ox, et donc le nombre d'e^- échangés par unité de temps.

$$i = \frac{dQ}{dt}$$

La vitesse de transformation varie en fonction du potentiel imposé à l'électrode indicatrice (ou de travail), électrode à la surface de laquelle se produit la réaction électrochimique ; pour imposer un potentiel à l'électrode indicatrice, on impose une différence de potentiel entre cette électrode indicatrice et une électrode de référence ; celle-ci ayant un potentiel connu, constant, cela revient à imposer un potentiel à l'électrode indicatrice.

$$\Delta E \text{ imposé} = [E \text{ ind} - E \text{ ref}]$$

La variation de la vitesse en fonction du potentiel, c'est-à-dire relation courant-potentiel, est directement traduite par la courbe intensité-potentiel obtenue.

E. Limitation de la vitesse des réactions électrochimiques par le transfert des corps électrolysés vers l'électrode

Lorsqu'on impose à une électrode un potentiel tel que se produit une réaction électrochimique consommant une substance dissoute peu concentrée (par exemple), cette réaction s'arrêterait sitôt que la substance électrolysée a disparu de la surface de l'électrode si n'intervenaient pas des phénomènes de transport, qui ont pour effet d'apporter du sein de la solution jusqu'au lieu de la réaction la substance consommée.
Ce transport est provoqué :

- par l'agitation de la solution (barreau magnétique) ou par une électrode tournante ou vibrante ;
- par diffusion : les solutés diffusant des endroits les plus concentrés vers les endroits les plus dilués, donc allant compenser la déperdition par électrolyse. La diffusion résulte nécessairement de l'électrolyse et permet à la réaction de se poursuivre.

En plus de ces modes de transports principaux, on doit envisager dans certains cas la possibilité d'un autre transport qui est dit de migration. Il n'affecte les corps électrolysés que s'ils sont ioniques et leur nombre de transport (t) appréciable :

$$t = \frac{\delta \times Z \times C}{\sum_i \lfloor \delta i \times Zi \times Ci \rfloor}$$

- δ : la conductivité équivalente de l'ion ;
- Z : la charge électrique de l'ion ;
- C : la concentration de l'ion.

L'indice i se rapporte à tous les ions de différente nature dans la solution.
Migration et diffusion auront même direction si un anion s'oxyde ou si un cation se réduit. Si, au contraire, un cation doit diffuser à l'anode pour subir une réaction électrochimique d'oxydation, son transport par migration vers la cathode va l'éloigner de l'électrode. Pour s'affranchir de ce mode de transport qui peut devenir gênant, il suffit de rendre négligeable leur nombre de transport et donc rendre négligeable C devant Σ Ci, c'est-à-dire que l'ion électrolysé doit être très dilué par rapport à ceux qui ne participent pas à la réaction électrochimique.
Ces ions libres non électroactifs assurant le passage du courant en solution seront apportés par un sel très dissocié dans l'eau (si l'électrolyse a lieu en milieu aqueux), et à concentration cent fois plus grande que les substances électrolysables. On ajoute ce que l'on appelle un électrolyte indifférent ($NaClO_4$, $NaNO_3$, Na_2SO_4).

F. Principe de la détermination des courbes intensité-potentiel = la voltampérométrie

Lorsqu'une électrode est le siège d'une réaction électrochimique, il existe une relation entre l'intensité du courant qui traverse cette électrode et son potentiel. Les concentrations des espèces électroactives sont des paramètres dont dépendent les courbes i/E mais, si l'on veut étudier la relation entre les 2 variables i et E, il faut que la variation des concentrations des espèces électroactives soit négligeable.
Cela impose que la quantité de substance consommée lors de la détermination expérimentale de la courbe i/E reste négligeable devant la quantité présente dans l'ensemble de la solution étudiée.

L'enregistrement du régime de diffusion stationnaire (par exemple, 10 mV par seconde).
L'enregistrement de i = f(t) conduit directement à i = f(E) si E est fonction linéaire de t.

c) Analyse des courbes i/E

Les courbes i/E se composent de différentes parties résultant des phénomènes suivants :

■ *Intervention du solvant – Domaine d'électroactivité*

Si on fait varier le potentiel d'une électrode inattaquable plongeant dans une solution aqueuse d'un électrolyte indifférent (aucune espèce électroactive) :

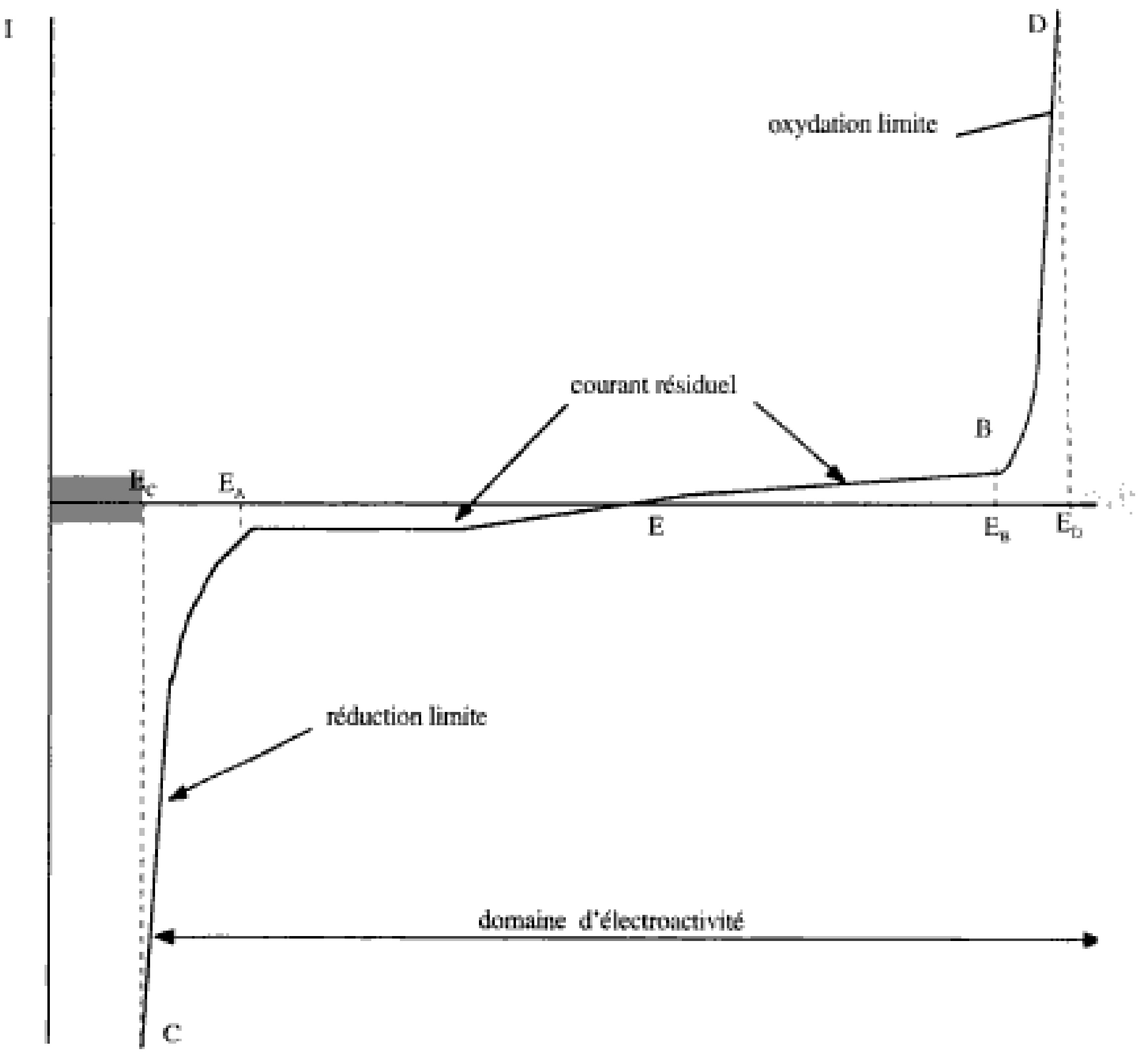
- à potentiel suffisamment oxydant, l'eau va être oxydée :

$$2H_2O - 4\,e^- \Leftrightarrow O_2\nearrow + 4H^+$$

- à potentiel suffisamment réducteur, l'eau va être réduite :

$$2H_2O + 2\,e^- \Leftrightarrow H_2\nearrow + 2OH^-$$

Dans les deux cas, l'espèce subissant l'oxydation ou la réduction est toujours présente à l'électrode, le courant ne sera pas limité par la diffusion.



D'après B. Trémillon, Électrochimie analytique et réactions en solution

Figure 3. Domaine d'électroactivité

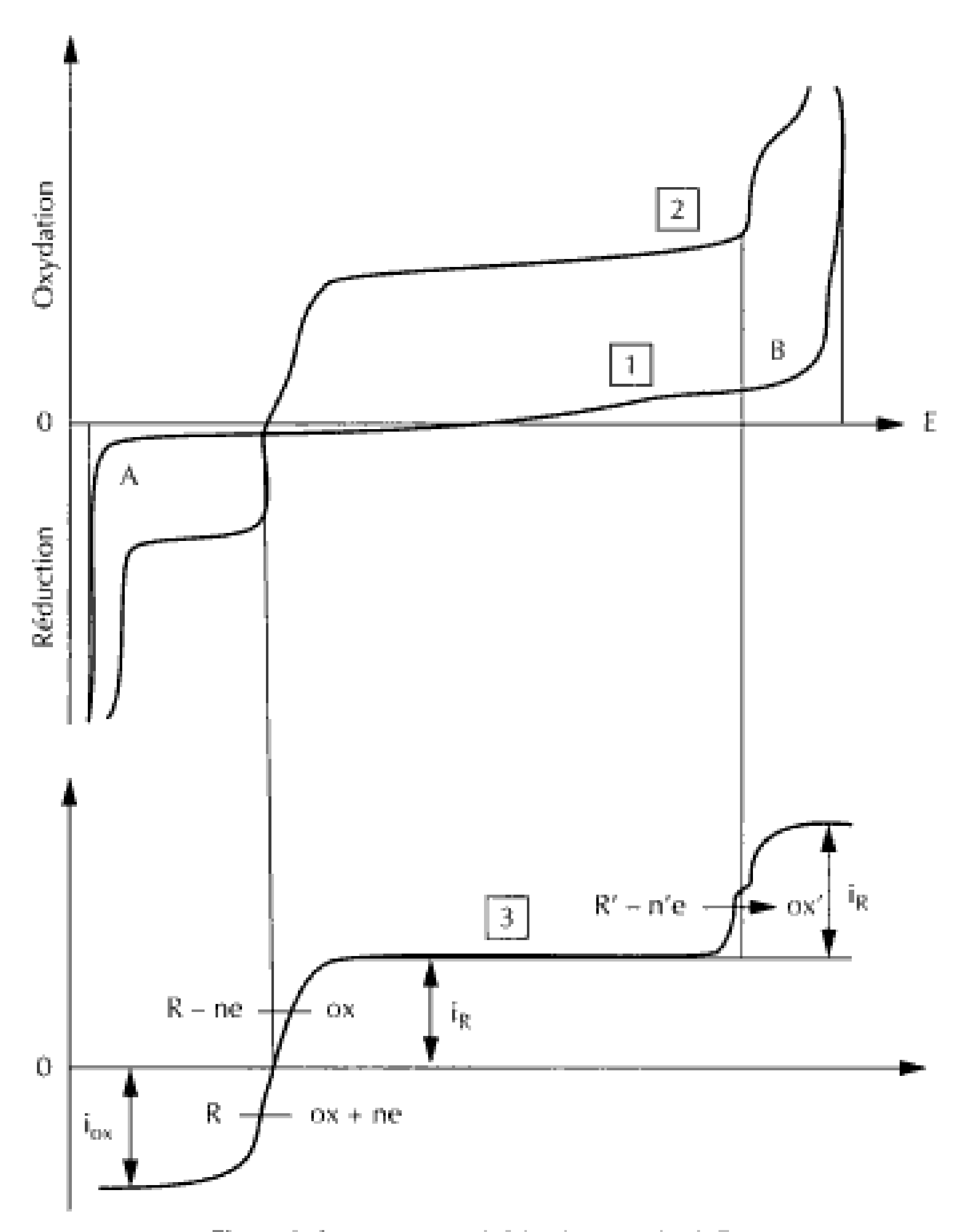


Figure 4. 1 : courant résiduel = partie A-B ;
2 : soluté électroactif + courant résiduel ; 3 : soluté électroactif seul

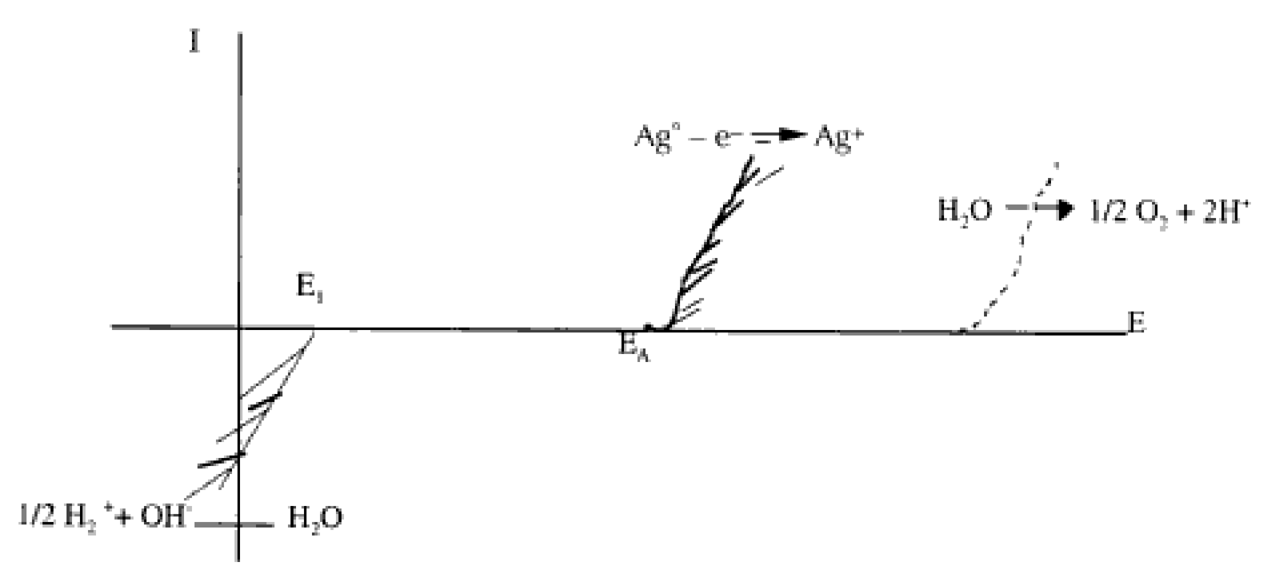


Figure 5. Le matériau de l'électrode est oxydable (E_A) sans palier de diffusion.
Les espèces oxydables après E_A ne seront pas électroactives à cette électrode

Le système $2H^{+} + 2\,e^{-} \Leftrightarrow H_2 \nearrow$

est lent à une électrode de platine ordinaire et à une électrode de mercure, tandis qu'il est rapide à une électrode de platine platiné (dépôt électrolytique de platine). Pratiquement, il faut souvent polir les électrodes pour en obtenir un fonctionnement reproductible et toujours dire avec quelle électrode on travaille.

■ ***Adsorption à l'électrode***

C'est un facteur important des modifications des courbes i/E.
Si c'est la substance électroactive elle-même qui est adsorbée, on a une augmentation de la vitesse électrochimique ; si ce sont des substances étrangères non électroactives qui sont adsorbées, il y a ralentissement et même inhibition de la réaction électrochimique.

■ ***Température***

Une élévation de la température fait augmenter les vitesses et rend donc les systèmes plus rapides.

■ ***Phénomènes de double couche***

L'ensemble de Helmoltz (couche compacte) plus couche de Gouy-Chapman (couche diffuse) constituent la double couche électrochimique selon le modèle de Stern. L'observation d'un courant dans une cellule alors qu'il ne se produit aucune réaction électrochimique est dit capacitif. L'origine de ce courant, de nature différente de celle du courant d'électrolyse, est le comportement électrique de l'interface électrode/électrolyte, où se produit une accumulation de charge de part et d'autre de l'interface à la manière d'un condensateur chargé. La charge accumulée d'un côté de l'interface est contre-balancée par celle accumulée de l'autre côté.

$$q^{sol} = -\,q^{el}$$

Si une variation de la charge interfaciale doit se produire au cours du temps (lorsque l'on fait passer le potentiel de l'électrode de E_1 à E_2), la variation de E occasionne le passage d'un courant capacitif.
Le courant capacitif intervient comme composante du courant résiduel mais, à l'électrode à goutte de mercure, la variation de superficie de l'électrode au cours du temps entraîne une variation de la capacité d'interface totale qui vient s'ajouter à celle due au balayage de potentiel ; et en polarographie, le courant capacitif constitue la composante principale du courant résiduel.

Équation des courbes i/E en régime de diffusion stationnaire
pour les systèmes électrochimiques rapides
(courant uniquement contrôlé par la diffusion stationnaire)

Pour un système symbolisé par

$$ox + ne^{-} \Leftrightarrow red$$

• en absence d'électrolyse (i = 0)

$$Eeq = Eo + \frac{0{,}058}{n}\log\frac{|ox|s}{|red|s}$$

On peut faire la distinction entre deux modes d'exploitation

- Les réactions électrochimiques sont utilisables pour réaliser la transformation complète d'une substance en solution, soit en vue d'une séparation, soit en vue d'un dosage. Elles permettent de déterminer la quantité de la substance présente dans un échantillon donné.
  - Électrodéposition ou électrogravimétrie : seule la transformation par électrolyse est réalisée, la détermination de la quantité étant faite par une autre méthode ;
  - Coulométrie : on détermine la quantité en même temps qu'on réalise la transformation électrochimique grâce à la mesure de la quantité d'électricité consommée durant cette réaction.
- Les réactions électrochimiques sont par ailleurs utilisables pour obtenir seulement un renseignement sur la composition de la solution, sans que celle-ci ait à subir de modification notable.

Ce sont des méthodes indicatrices : elles permettent de déterminer la concentration d'une substance présente en solution.

On dispose de deux grandeurs physiques mesurables : le potentiel d'électrode et l'intensité du courant d'électrolyse

Il y a donc deux types de détermination :

- Déterminations potentiométriques effectuées à intensité constante :
  - soit à $i = 0$ et on mesure les potentiels d'équilibre ;
  - soit à i imposé (très faible) ;
  - les indications potentiométriques sont reliées aux concentrations par des fonctions logarithmiques.
- Déterminations ampérométriques effectuées à potentiel imposé (différence de potentiel imposé).

  Les indications ampérométriques sont reliées directement aux concentrations.

  Au contraire des méthodes quantitatives (électrodéposition, coulométrie), il est ici nécessaire de réaliser une microélectrolyse de telle façon que la mesure effectuée ne consomme qu'une partie négligeable de la substance à déterminer.

  Quand il suffit de mettre en évidence un point équivalent au cours des titrages, on peut utiliser les variations de potentiel au point équivalent, ou les variations d'intensité de courant (potentiométrie et ampérométrie sont ici utilisées comme méthodes indicatrices associées à la méthode quantitative qu'est la titrimétrie).

II. Méthodes électrochimiques d'analyse

A. Les déterminations potentiométriques

Elles sont effectuées au moyen d'une électrode indicatrice de l'espèce à contrôler (par exemple, H^+, Na^+, K^+) mise au contact de la solution à étudier et opposée à une électrode de référence.

On mesure ainsi une différence de potentiel électrique variant comme le potentiel de l'électrode indicatrice. Ce potentiel doit être relié à l'activité de l'espèce à déterminer, relation qui devra être très sélective vis-à-vis de cette espèce, donc la plus indépendante possible des autres espèces en solution.

Il faut ici distinguer deux catégories d'électrodes indicatrices.

1. Électrodes indicatrices à système redox

Ce sont des électrodes métalliques dont le potentiel d'équilibre est déterminé par un système redox faisant intervenir l'espèce à contrôler.

a) L'espèce à mesurer (H^+) intervient directement comme forme oxydée

$$2H^+ + 2e^- \Leftrightarrow H_2^{\nearrow}$$

ENH (électrode normale à hydrogène) : Eo potentiel normal = 0 V si $|H^+| = 1$ M ou si pH = 0.
Dans le cas de substances volatiles ($H_2^{\nearrow}$), la concentration peut être remplacée par la pression partielle en équilibre avec la solution (la solubilité est proportionnelle à la pression partielle).

$$E = Eo + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{|H^+|^2}{H^{2\nearrow}}$$

L'électrode à hydrogène indicatrice de pH.
L'électrode est métallique : platine « platiné », la pression partielle de H_2 est maintenue fixe, l'activité de H^+ est variable.
La différence de potentiel mesurée :

$$E = \frac{2,3RT}{F} \log \frac{aH^+}{pH_2^{1/2}}$$

ΔE_H^0 étant le potentiel de l'électrode à hydrogène dont le pH de la solution est égal à 0.

$$\frac{2,3RT}{F} \text{ équivaut à 58 mV à 20°}$$

Avant la mesure de pH, on doit effectuer un étalonnage au moyen de solutions de pH connus.

b) L'espèce à déterminer intervient dans le système redox, non plus comme ox ou red mais comme espèce auxiliaire

Par exemple : mise en jeu d'ion H^+, espèce auxiliaire pour l'électrode à quinhydrone (dibase) utilisant le couple benzoquinone Q | hydroquinone H_2Q.

$$Q + 2e^- + 2H^+ \Leftrightarrow H_2Q$$

à [Q]/[H2Q] constant et pH < 8 correspond une variation de potentiel suivant :

$$-\frac{2,3RT}{F} pH$$

comme dans le cas de l'électrode à hydrogène (*fig. 7*).
L'utilisation des électrodes indicatrices métalliques à système redox est limitée du fait des conditions très strictes, le milieu étudié ne devant pas provoquer la destruction d'un composant du système indicateur (par exemple, à pH > 8 oxydation de H_2Q par l'oxygène ambiant).

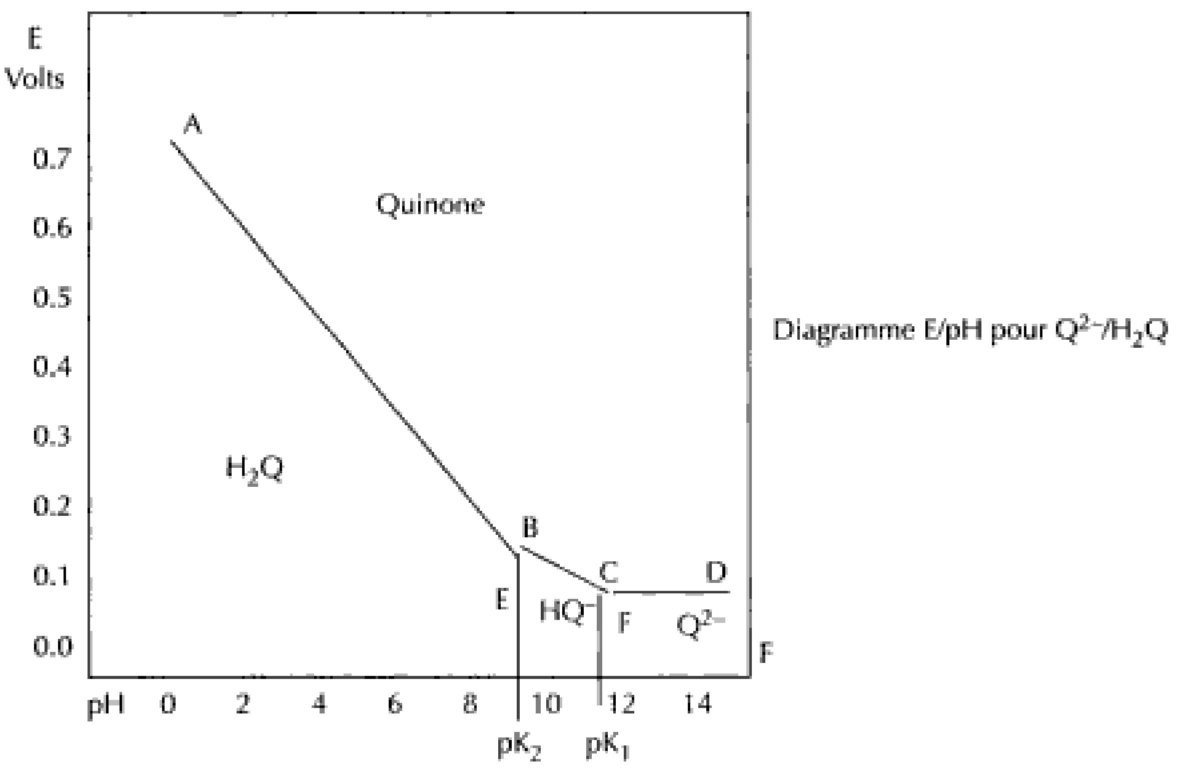


Figure 7. Diagramme E/pH pour Q^{2-}/H_2Q

2. Électrodes indicatrices à membrane sélective (et non spécifique) fonctionnant comme un échangeur ionique

Lorsqu'on interpose une membrane (dite électrochimique de nature électrolytique, c'est-à-dire conductrice ionique) entre deux solutions, celle-ci joue le rôle d'échangeur d'ions. Pour un ion, s'il existe entre les solutions qui baignent les deux faces de la membrane une dissymétrie de concentration, il existera une différence de potentiel : c'est cette différence de potentiel que l'on appelle potentiel de membrane.
La présence d'une membrane dans la chaîne potentiométrique comportant deux électrodes de référence (et par conséquent, leur différence de potentiel est fixée, constante) permet de mesurer une ΔE totale (*fig. 8*).

$$\Delta E = \text{Cte} + \text{potentiel de membrane}$$

La ΔE totale varie donc comme le potentiel de membrane. On a vu que celui-ci correspondait à la différence de potentiel des solutions des 2 côtés de la membrane, donc :

Potentiel de membrane $\quad \dfrac{2{,}3RT}{Z_A F}\log\dfrac{aA^{ext}}{aA^{int}}$

Z étant le nombre de charges de l'ion ;
A l'ion de part et d'autre de la membrane ;
a = activité (a = f·c).
Si, dans la solution interne, on fixe l'activité de A, celle-ci devient constante et on peut écrire :

$$\Delta E_{totale} = \text{Cte} + \frac{2{,}3RT}{Z_A F}\log aA^{ext}$$

À force ionique déterminée, la ΔE totale est fonction du log de la concentration de A.

$\dfrac{2{,}3RT}{Z_A F}$ représente la pente de l'électrode à membrane échangeuse de A.

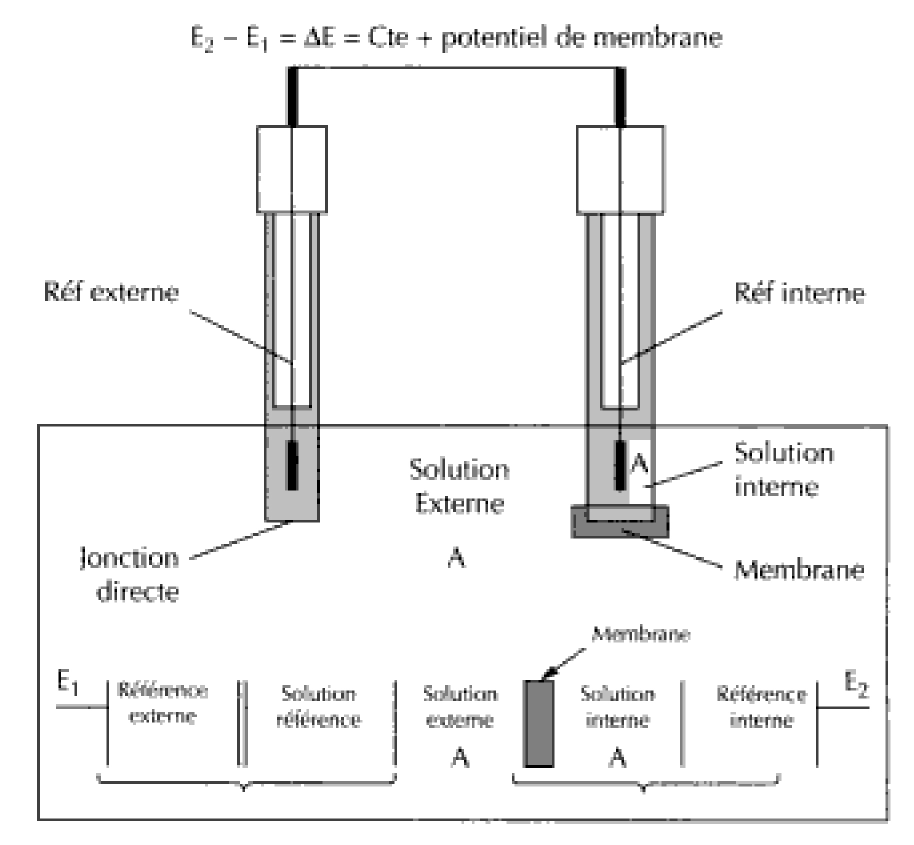
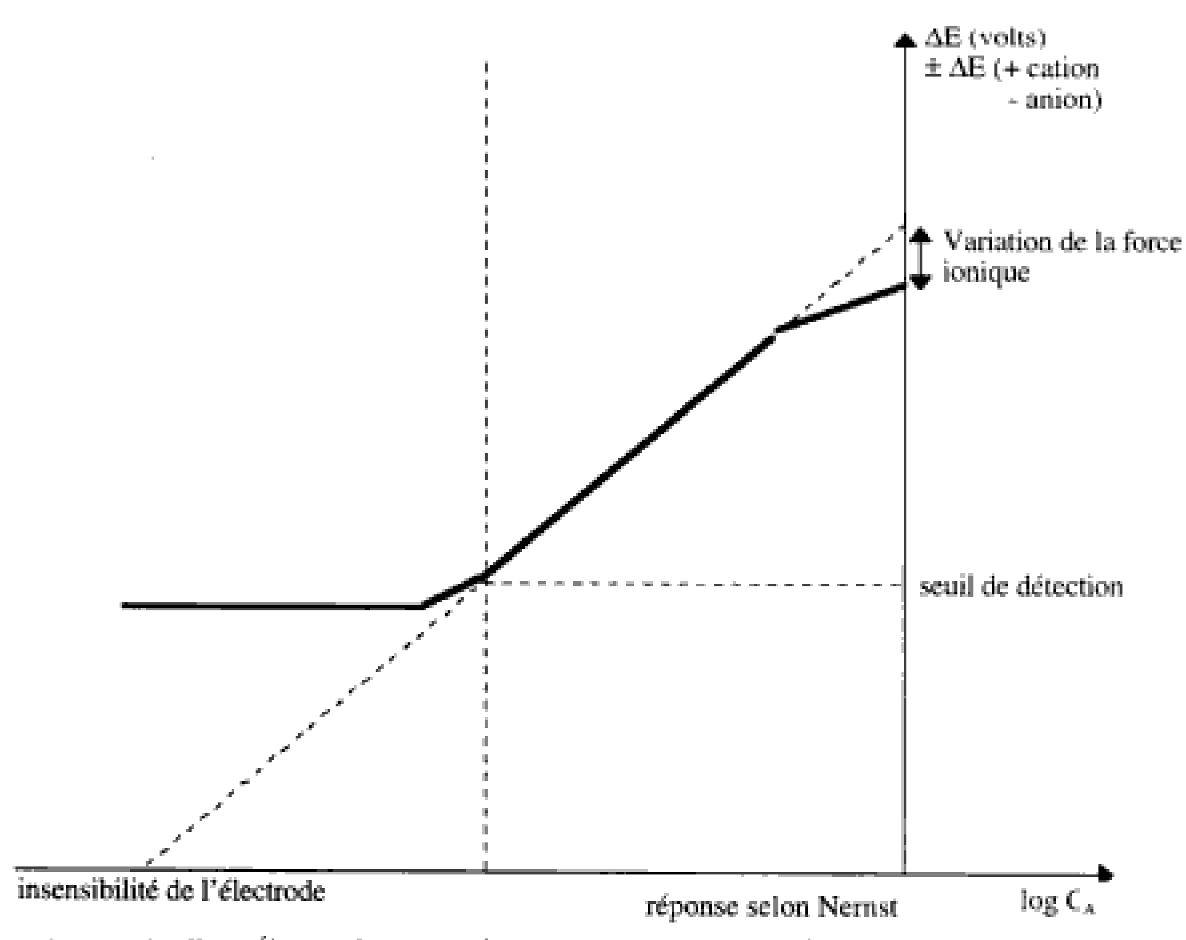


Figure 8. Chaîne potentiométrique d'une électrode indicatrice d'ion à membrane sélective (indicatrice de l'ion A)



D'après B. Trémillon. *Électrochimie analytique et réactions en solution*

Figure 9. Courbe d'étalonnage $\Delta E = f(\log C_A)$ d'une électrode à membrane sélective indicatrice de l'ion A

Après un étalonnage avec des concentrations connues de A, on peut distinguer :
- un domaine où la réponse de l'électrode obéit à la loi de Nernst ;
- un domaine où la réponse traduit un écart à la loi de Nernst et qui correspond à des concentrations très faibles : on peut expliquer ce phénomène si l'on considère que la membrane est sélective mais non spécifique pour A.

Cela signifie qu'un autre ion B peut prendre la place de A dans la membrane (M) selon :

$$A_M + B_{sol} \Leftrightarrow B_M + A_{sol}$$

avec

$$KA/B = \frac{(CB)_M X (CA)_{sol}}{(CA)_M X (CB)_{sol}}$$

$$(C°)_M = (CB)_M + (CA)_M$$

$$(CB)_M = (C°)_M - (CA)_M$$

si p représente le rapport $\frac{(CB)sol}{(CA)sol}$

il vient

$$KA/B = \frac{(C°)_M - (CA)_M}{(CA)_M} \times \frac{1}{p}$$

et

$$\frac{(C°)_M - (CA)_M}{(CA)_M} = KA/B \cdot p$$

$(CA)_M$ xp·KA/B = $(C°)_M - (CA)_M$
$(CA)_M + (CA)_M$ xp·KA/B = $(C°)_M$
$(CA)_M$ [1 + p·K A/B] = $(C°)_M$

$$\boxed{(CA)_M = \frac{(C°)_M}{1 + p \cdot K\ A/B}}$$

Si KA/B a une valeur faible, en présence de B la concentration de A dans la membrane reste voisine de celle existant initialement, et la réponse potentiométrique est pratiquement la même.

Si KA/B est supérieur à 1, la concentration de A dans la membrane va être diminuée par la présence de B en solution, ce qui conduit à une valeur de potentiel de membrane plus faible.

L'écart entre cette réponse et la réponse idéale pour A représente :

$$\frac{2{,}3RT}{Z_A F}\log(1 + p \cdot K\ A/B)$$

écart dépendant du rapport existant entre (A) et (B) et de la valeur kA/B = kA/B × rapport de mobilité des deux ions ans la membrane [m(B)/m(A)]M.

KA/B est le coefficient de sélectivité potentiométrique de la membrane pour le couple A/B.

Si l'on obtient pour A une réponse selon Nernst jusqu'à 10^{-6} M, en présence de B = 1 M, il faut que la membrane présente une sélectivité potentiométrique correspondant à un KA/B < 10^{-6}, ce qui revient à dire que B a beaucoup moins d'affinité (10^{-6}) pour cette membrane que A.

a) Principales électrodes indicatrices d'ions à membrane sélective

En biologie, les électrodes à membrane sélective sont les plus utilisées : détermination Na^+, H^+, K^+, Cl^-. Elles représentent un groupe important de détecteurs chimiques. La construction est la même pour toutes : un tube de verre ou de plastique se terminant par la membrane ayant les propriétés spéciales d'échange ; le tube est rempli avec une solution contenant l'ion. Si l'on veut doser H^+, la solution sera HCl, si l'on veut doser Na^+, la solution sera du chlorure de sodium, etc.
Le contact électrique est établi par une électrode de référence interne, de type Ag-AgCl plongeant dans la solution de remplissage.
Il est classique de distinguer ces électrodes selon le type de la membrane. Il peut s'agir d'une membrane solide, ou liquide.

■ *Membrane solide*

Verre = réseau qui fonctionne comme un échangeur compact et homogène.
La sélectivité d'une électrode de verre est fonction de la composition chimique de la membrane.

- Elle est indicatrice de pH si le verre est constitué de Si O_2 (72 %), Na_2O (22 %), CaO (6 %). On obtient une réponse selon Nernst jusqu'à pH 11, ensuite il existe une déviation qu'on appelle « erreur alcaline ».
  Un verre au lithium (SiO_2, Li_2O, BaO) permet de mesurer des pH très alcalins.
- Elle est indicatrice de Na^+ si on ajoute Al_2O3 à la composition du verre ; elle est plus sélective vis-à-vis du Na^+ que du K^+ puisque $KNa^+/K^+ = 3.10^{-3}$; on travaille en milieu neutre ou alcalin pour que l'activité du H^+ soit faible (pH 7 à pH 11).
  Des verres sélectifs vis-à-vis des cations monovalents ont été fabriqués : K^+, Li^+, Ag^+, etc., mais aucune membrane de verre ne présente une sélectivité suffisante vis-à-vis des cations divalents.
- Électrode à pCO_2
  La pCO_2 est définie comme la pression partielle de CO_2 dans une phase gazeuse en équilibre avec le sang. Elle est corrélée à la concentration du CO_2 dissous (*fig. 10*).

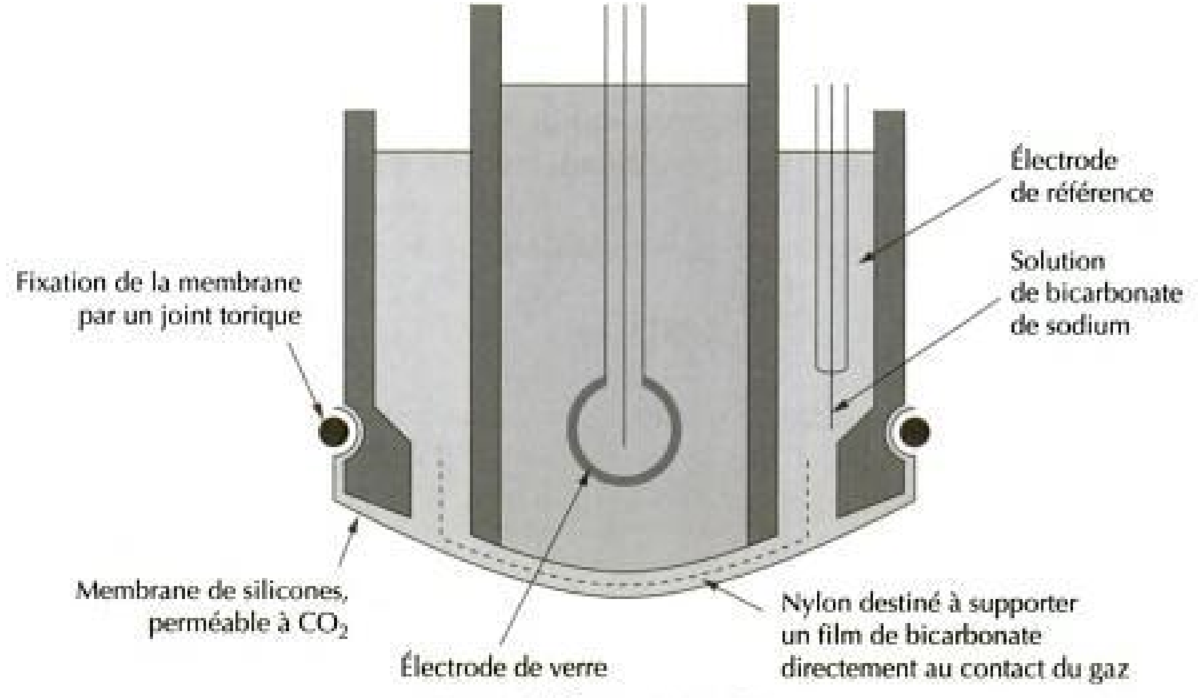


Figure 10. Électrode à pCO_2

Pour simplifier $$d = \frac{FSD}{\delta}$$

$$i = \pm nd\ [Cs - Cel]$$

À la plus grande valeur possible du gradient de concentration, soit Cel = O, correspond le courant-limite de diffusion, et il apparaît un courant proportionnel à la concentration en solution.

$$i_l = \pm ndCs$$

1. Vagues successives

Une substance oxydable Red peut présenter un système d'oxydation suivant

$$Red - n_1e^- \Leftrightarrow A \quad 1)$$

À un potentiel plus élevé que celui nécessaire à la première réaction, on obtient :

$$A - n_2e^- \Leftrightarrow ox \quad 2)$$

Si les deux systèmes sont rapides, on obtiendra deux vagues successives et le potentiel de demi-vague ($E1/2 = \frac{iox + ired}{2}$) de chaque système aura une valeur très voisine de leur potentiel normal ; Les courants-limites correspondant aux deux vagues successives sont dans le rapport des nombres d'électrons n_1 et n_2.

A est une espèce amphotère, c'est-à-dire dont l'état d'oxydation est intermédiaire entre red et ox.

A est une espèce stable thermodynamiquement, ou métastable (en théorie non stable, mais qui apparaît stable en raison d'une vitesse de transformation très faible). Un exemple type est celui du comportement électrochimique de l'oxygène dissous dans l'eau dont l'étude a permis l'élaboration de l'électrode à pO_2.

2. Système de l'oxygène

L'oxygène présente les degrés d'oxydation –II, –I et zéro. Les systèmes oxydoréducteurs correspondants sont extrêmement lents et, quelle que soit l'électrode, fournissent des vagues totalement irréversibles (*fig. 12*).

On peut donc traiter à part :

- l'oxydation de l'oxygène (–II) (donc de l'eau et des ions HO^-) ;
- la réduction de l'oxygène dissous dans l'eau, paramètre très important pour le biologiste puisque

$$O_2 \text{ dissous} = apO_2$$

a = solubilité de l'oxygène en mL/mL de sang.

a = 0,023 mL/mL de sang à 760 nm de mercure. Ce qui correspond à une solubilité de 10^{-3} M.

Réduction de l'O_2 dissous

Globalement, O_2 dissous dans l'eau doit être réduit jusqu'à l'état O^{2-} mais il existe aussi en solution aqueuse un degré d'oxydation intermédiaire O_2^{2-} dans H_2O_2.

opère dans les conditions d'obtention d'un courant-limite de diffusion, l'intensité du courant sera proportionnelle à (O_2) dissous. Les valeurs de courant, qui sont extrêmement petites, seront amplifiées puis corrélées aux pO_2.
L'électrode de Clark (à pO_2) est basée sur ce principe (*fig. 13*) :

- une membrane en polypropylène perméable à l'oxygène ;
- une électrode platine (indicatrice) à laquelle on impose un potentiel où se produira la réduction de O_2 dissous (cathode) ;
- une électrode de référence qui est généralement Ag°/AgCl en milieu électrolyte pH < 5. On mesure une intensité de courant. C'est donc une méthode ampérométrique à une électrode de platine (et non polarographique).

On réalise l'étalonnage avec :

- un gaz pur contenant O % d'oxygène ;
- un gaz contenant 20 % d'oxygène.

Comme pour toutes les électrodes, on admet une différence entre valeur calculée et valeur mesurée (dérive), mais on donne aussi un chiffre à ne pas dépasser pour cette dérive.

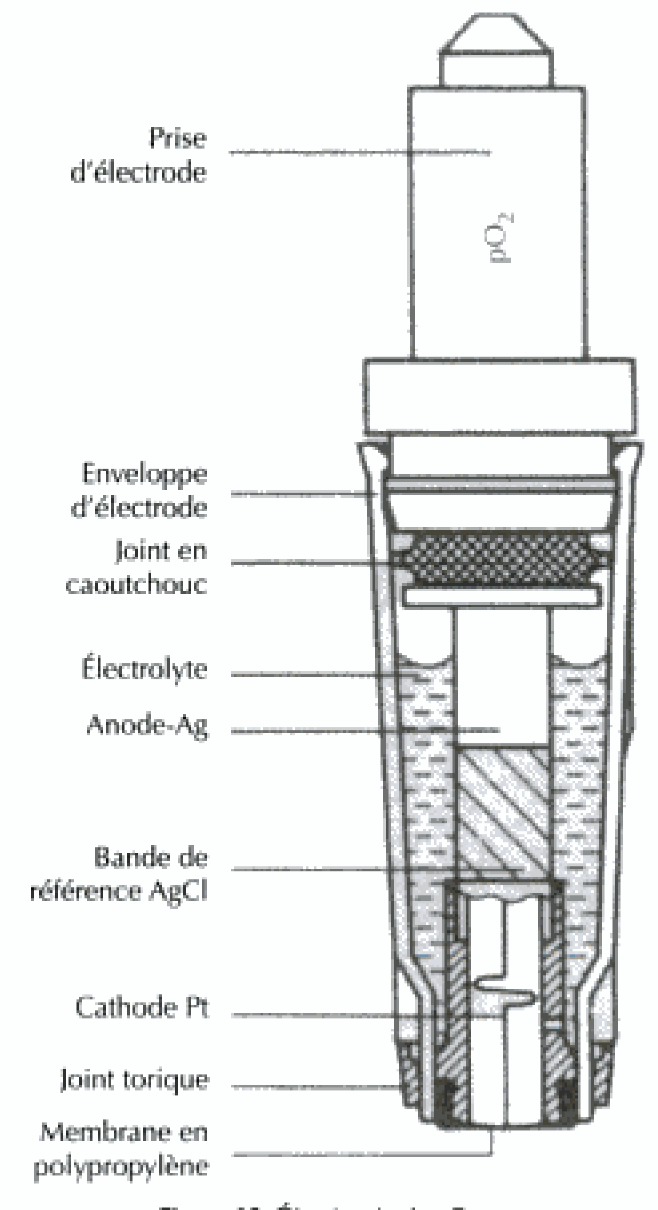


Figure 13. Électrode à pO_2

C. Électrodes à enzymes

Elles ne constituent pas un type d'électrodes particulier mais elles combinent l'emploi des électrodes classiques et des enzymes.
Il faut associer une réaction enzymatique, qui assurera la spécificité de la réaction si elle est bien choisie, à une détection électrochimique d'espèces dont la concentration varie au cours de la réaction.
Elles sont caractérisées comme les autres électrodes par :

- la limite de détection ;
- la linéarité de la réponse ;
- la sélectivité ;
- la dérive de la réponse.

Mais elles présentent des propriétés particulières dues à l'emploi d'enzyme immobilisé : préparation de la membrane enzymatique, conservation des propriétés de cette membrane, stabilité de la réponse, temps de réponse.
Les mesures sont soit potentiométriques, soit ampérométriques (cette dernière est la plus utilisée pour la détermination des paramètres biologiques).

c) Sensibilité et précision

La sensibilité est limitée, non par la mesure des courants qui peuvent être très petits, mais par la reproductibilité des mesures et l'existence du courant capacitif, composante la plus importante du courant résiduel en polarographie.

2. Évolution

Les techniques polarographiques ont évoluées justement pour améliorer :
- la sélectivité : par dérivation des vagues polarographiques ; la vague est transformée en une courbe en forme de cloche dont le maximum correspond au potentiel de demi-vague ;
- la sensibilité : il s'agit alors de polarographie à impulsions.

Ces améliorations permettent de déterminer les concentrations de l'ordre de 10^{-7} M, et 30 à 50 mV entre deux $E^{1/2}$ successifs suffisent pour séparer deux espèces électroactives.

III. Titrages électrochimiques

Un titrage consiste à réaliser une transformation quantitative d'une substance à doser, par une réaction chimique, avec un réactif que l'on introduit progressivement dans le milieu.
Connaissant les coefficients stœchiométriques de la réaction, on relie la quantité de substance à doser à la quantité de réactif ajouté. La fin de la réaction ou point équivalent permet de connaître cette quantité ajoutée.
Pour réaliser un titrage, il faut savoir :

A. Comment ajouter le réactif titrant en quantité progressive connue

- Avec une solution préalablement titrée : titrages volumétriques classiques ;
- En introduisant le réactif par électrolyse, en quantités connues coulométriques : titrages coulométriques.
  Le réactif titrant est préparé par électrolyse, extemporanément et généralement in situ. On peut travailler à intensité constante, la quantité ajoutée est alors proportionnelle au temps (t) d'électrolyse.

$$Q = \frac{i_o}{nF}t$$

Il suffit de mesurer le temps avec un chronomètre.
Dans la méthode de dosage de l'eau selon Karl Fischer :

I_2 + SO_2 (hydrogénosulfite dans le méthanol) + H_2O $\longrightarrow$ $2I^-$ + hydrogénosulfate.

L'iode est un réactif instable mais, si l'on génère l'iode par oxydation anodique d'une solution d'iodure (cellule compartimentée), on augmente considérablement la sensibilité de la méthode.
Une mole d'eau nécessite 2 faradays (2 électrons en jeu), soit 193 000 coulombs, donc 1 mg d'eau équivaut à 10,72 coulombs.

En principe, tout titrage volumétrique est transposable en titrage coulométrique et celui-ci présente des avantages certains : la mesure du temps est plus précise que la mesure d'un volume, pas de dilution, et surtout plus besoin d'étalonnage puisque c'est la valeur du courant imposé i_o qui tient lieu de titre.

B. Comment déterminer le point équivalent d'une réaction

Lors d'une réaction de titrage par introduction progressive d'un réactif dans une solution où plonge une micro-électrode indicatrice, les variations de composition de la solution entraînent des modifications des caractéristiques voltampérométriques ; ces modifications conduisent à une variation soit du potentiel de l'électrode (à intensité imposée), soit de l'intensité de courant (à potentiel imposé) et le point équivalent apparaîtra comme un point singulier.
Pour mettre en évidence de façon aussi nette que possible la position du point équivalent, on peut utiliser les schémas suivants :

- 2 électrodes, une référence et une indicatrice, mais on dit « travailler à une électrode indicatrice » ;
- 2 électrodes identiques, toutes deux indicatrices mais l'une travaillera comme anode et l'autre comme cathode. On suit les variations de différence de potentiel entre ces deux électrodes au cours du titrage.

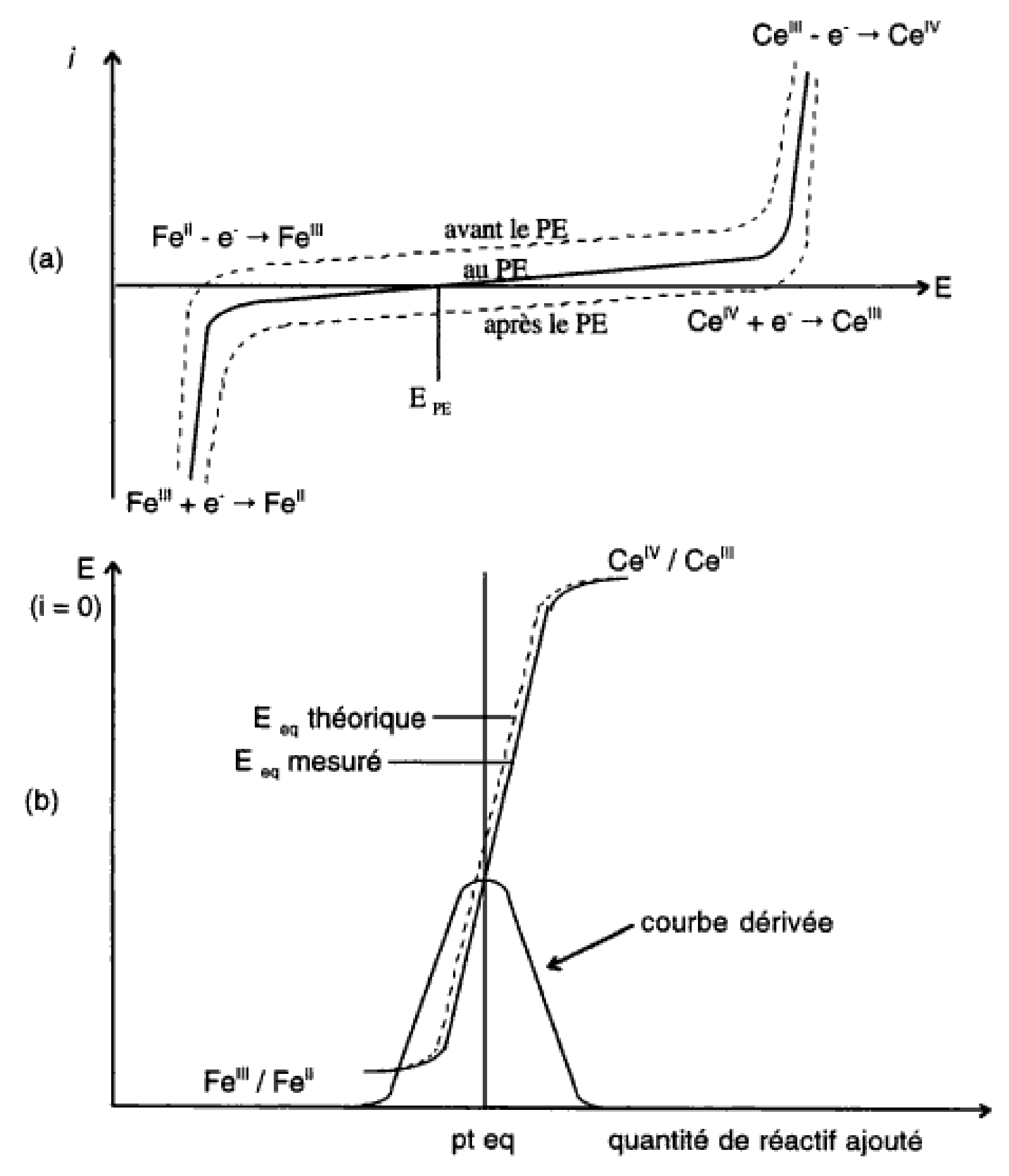
1. À une électrode indicatrice

a) Potentiométrie à intensité imposée constante

À courant nul (i = 0) et théoriquement, on suit les variations du potentiel d'équilibre à l'électrode indicatrice.
Exemple d'une solution de Fe II à laquelle on ajoute du Ce IV : à une électrode de platine on va mesurer

$$E \text{ équilibre} = E_o + \frac{0{,}058}{n} \log\frac{[Ox]}{[Red]}$$

Avant le point équivalent, on suit le potentiel correspondant au système du fer selon le rapport Fe III formé/Fe II restant, puis, après le point équivalent, le potentiel correspondant au système du cérium selon le rapport Ce IV en excès/Ce III formé ; mais juste au moment du point équivalent, la solution ne contient que du Fe III et du Ce IV dont il ne peut résulter qu'un potentiel mixte (*fig. 14*).
Il en est de même dans toute une portion de la courbe de titrage autour du point équivalent jusqu'à ce que la concentration, soit de Fe II, soit de Ce IV, ait une valeur suffisante pour que le potentiel mesuré se rapproche du potentiel d'équilibre.
Dans ce domaine, le potentiel mesuré est instable, non reproductible, au contraire de ce qui se passe quand on mesure un potentiel d'équilibre. Ce domaine est d'autant plus étendu que les concentrations sont plus faibles et cela limite donc la sensibilité de la méthode.
Si la réaction est très quantitative, le saut de potentiel se produit au cours de l'addition d'une très petite quantité de réactif supplémentaire, et l'on peut localiser le point équivalent avec une bonne précision ; mais si la réaction n'est pas très quantitative, la variation au voisinage du point équivalent n'est plus aussi rapide ; il a

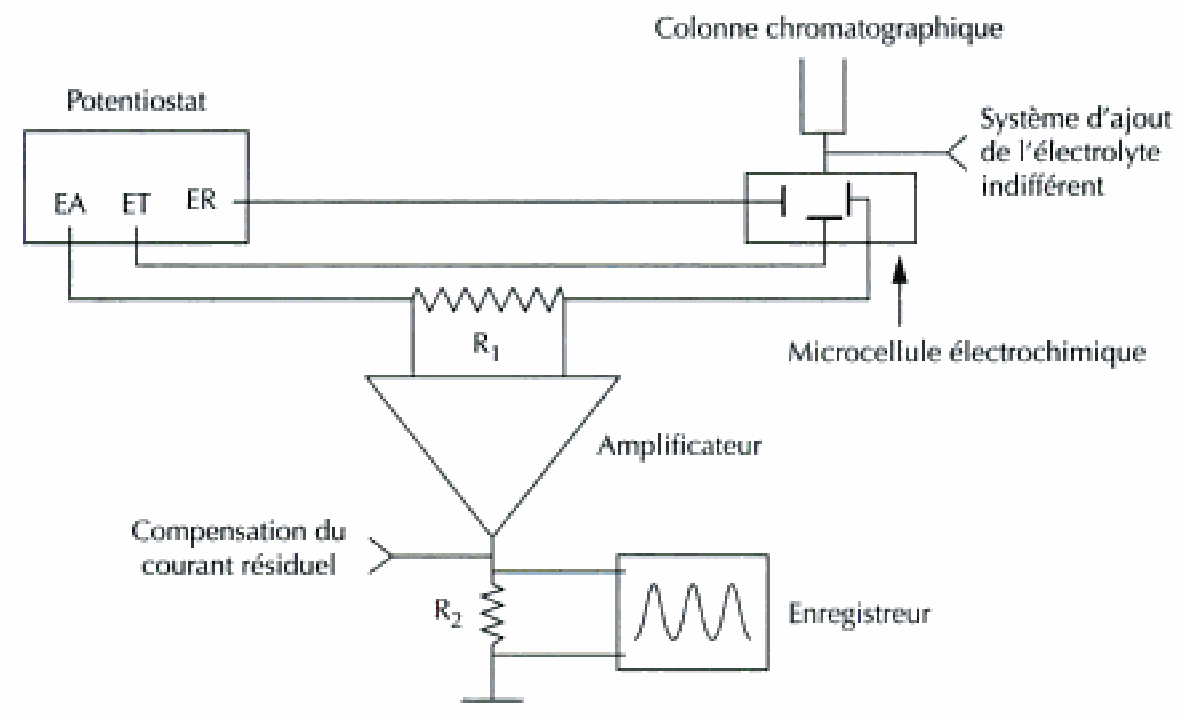


a) Courbe i/E
b) Variation des Eeq en fonction de la quantité de réactif ajouté

Figure 14. Courbe de titrage potentiométrique à i = 0

été proposé une méthode qui consiste à dériver la courbe et à prendre au point équivalent le maximum de la dérivée, mais les valeurs au voisinage du point équivalent ne sont pas des valeurs à l'équilibre et la courbe n'obéit pas dans cette région à une équation théorique.

Pour suivre un titrage, la potentiométrie à courant nul ne peut être mise en œuvre qu'à la condition d'avoir des systèmes électrochimiques rapides. Dans le cas de systèmes lents, le potentiel mesuré conserve son caractère de potentiel mixte, mal défini, tout le long du titrage, et la courbe obtenue est inexploitable.



D'après C. Combellas. Feuillet de biologie n° 122

Figure 16. Schéma de principe d'un montage à 3 électrodes avec amplification du courant d'électrolyse et compensation du courant résiduel

2. Ampérométrie

Il s'agit d'une microélectrolyse ne transformant qu'une fraction du soluté lors du passage dans la cellule ; au potentiel choisi, l'intensité est alors proportionnelle à chaque instant à la concentration du soluté qui traverse la cellule, ce qui permet de procéder à un étalonnage.
Méthode extrêmement sensible, la CLHP couplée à une détection électrochimique de ce type permet par exemple la détermination des catécholamines circulantes, des benzodiazépines, de la morphine, etc.

L'essentiel de la question

Une réaction électrochimique représente la transformation chimique produite par le passage d'un courant électrique correspondant au transfert de charges à l'interface électrode/électrolyte au cours de l'électrolyse. Le courant qui traverse cette interface traduit la vitesse de transformation de Ox ⇔ Red et donc le nombre d'électrons échangés par unité de temps.
Ox ⇔ Red est donc le nombre d'électrons échangés par unité de temps. Cette vitesse est limitée par le phénomène de transport à l'électrode ; il faut que celui-ci ait lieu à une vitesse constante, ce que l'on obtient par agitation ; on atteint alors le régime de diffusion stationnaire.
Lorsqu'une électrode est le siège de réactions électrochimiques, il existe une relation entre l'intensité du courant qui traverse cette électrode et son potentiel. Les courbes i/E apparues sont fonction des concentrations des espèces électroactives, mais si l'on veut étudier la relation i/E, il faut que la variation des concentrations soit négligeable. Les intensités de courant doivent être très faibles, il s'agit de microélectrolyse.

1. Dérivés de la cellulose

La Cellophane® (invention française en 1911, marque déposée) est une pellicule de cellulose régénérée, obtenue à partir de la viscose. Sa fabrication consiste en une alcalinisation par l'hydroxyde de sodium de fibres de bois (ou de coton, matériau plus pur), suivie d'une maturation à chaud. Enfin, l'action du sulfure de carbone produit le xanthate de cellulose – instable –, donnant une solution colloïdale visqueuse nommée : viscose. Puis la viscose est étalée dans une trémie à longue fente sous forme de film très mince. En milieu acide, ce film se décompose en xanthate et en cellulose hydratée. Cette pellicule cellulosique est ensuite traitée, puis desséchée. Elle porte alors le nom de « Cellophane® » ou « cellulose Visking® ». Le diamètre des pores (irréguliers) de la Cellophane® est voisin de 2,5 nm. Son utilisation est actuellement réservée à la dialyse.
Un autre procédé de fabrication, réalisé en présence de solution ammoniacale d'oxyde de cuivre, confère à la pellicule cellulosique des propriétés spéciales. Elle porte alors le nom de « Cuprophane® ».

2. Membranes organiques

Les matériaux les plus utilisés sont :
- les esters de cellulose (acétate, triacétate), dont les groupements hydroxyle du matériau de base (cellulose) sont remplacés par des groupements acétyles. Ces membranes sont sensibles aux grandes variations de pH, ainsi qu'à la température. Elles sont non stérilisables ;
- les polyamides et polyimides [R-NH-CO-R']n : de grande stabilité chimique, thermique et mécanique ;
- les polysulfones [RSO_2-R'-O]n : stérilisables pour certaines, stables entre pH 1 et 13, mais adsorbant les protéines ;
- le polycarbonate de bisphénol (à pores très réguliers et cylindriques ; $10^7/cm^2$) est une membrane isotrope ;
- les acryliques : polymères, ou copolymères, ou alliages de polymères, sont des membranes très stables ;
- les polymères fluorés : dont le polytétrafluoroéthylène (PTFE ou Téflon®), et le polyfluorure de vinylidène (PVDF). Ils sont très inertes et stérilisables ;
- les membranes utilisées pour l'osmose inverse : acétates de cellulose, polyamides, polyesters, polyurée, polyétheramide ;
- les membranes ioniques utilisées en électrodialyse sont des polymères contenant des groupements chargés : sulfonique, carboxylique, phosphorique ; alkylammonium, sulfonium, phosphonium.

III. Dialyse

Le terme de « dialyse » vient du grec *δια*, « à travers », et *λυειν*, « dissoudre ». Les travaux du chimiste écossais Thomas Graham (1805-1869) relatifs à la diffusion des gaz (1846) et aux colloïdes (1850) ont permis d'expliquer en partie la diffusion des petites espèces en solution.

C. Phénomène d'osmose

Dans la dialyse, le phénomène d'osmose n'est pas négligeable. En effet, considérons le dialyseur de T. Graham (*fig.* 2). La solution à dialyser (macromolécules) est dans le compartiment A, le liquide dit « de contre-dialyse » (LCD) est dans le compartiment B, ces deux domaines étant séparés par une membrane semi-perméable (m).

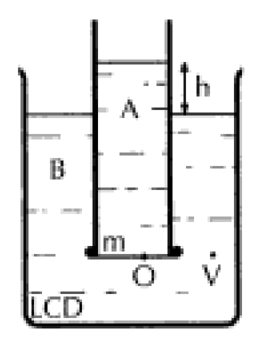


Figure 2. Dialyseur de T. Graham

Le milieu A contient des macromolécules en forte concentration comparativement au LCD, constitué d'une solution à très faible concentration en espèces dissoutes. L'eau du LCD va traverser la membrane de B vers A, dans le but d'équilibrer les deux solutions. Cette diffusion entraîne donc une élévation du niveau du liquide de A d'une valeur *h*, de telle façon que la différence des pressions (ΔP) aux points O et V, est égale à : h.ρ.g (ρ étant la masse volumique du rétentat). Cette différence de pressions ΔP correspond à la pression osmotique de la solution macromoléculaire. La pression osmotique colloïdale est due uniquement aux macromolécules ne traversant pas la membrane, et dont la concentration molaire est Cosm. = (n/V). Cette pression osmotique Π, est directement proportionnelle à la concentration en macromolécules :

$$\Pi = \frac{n}{V}.R.T \text{ (loi de Van't Hoff) ou : } \Pi = Cosm.R.T \text{ avec :}$$

- n : nombre de moles dissoutes dans le volume V ;
- R : constante des gaz parfaits ;
- T : température (K).

En dialyse, l'osmose est un phénomène parasite, entraînant une dilution de la solution macromoléculaire, par entrée de solvant.

D. Appareillages et méthodologies

De très nombreux appareils ont été décrits, tentant d'améliorer le rendement de la dialyse ou de faciliter son utilisation.

1. Dialyseur de T. Graham

Voir la *figure* 2.

2. Dialyseur de Monod

Le dialyseur de Monod (*fig.* 3) utilise un boyau de dialyse totalement immergé. Ce boyau contient le liquide à dialyser ainsi qu'un lest (souvent une ou plusieurs billes de verre) et un volume d'air. Il est fermé à ses extrémités par un simple nœud (ou par des pinces à plis en matière plastique, ou par des bouchons spéciaux). Un volume d'air est nécessaire pour éviter l'éclatement possible du boyau, en raison d'une entrée non négligeable d'eau du LCD par osmose, ainsi que pour aider au flottage.

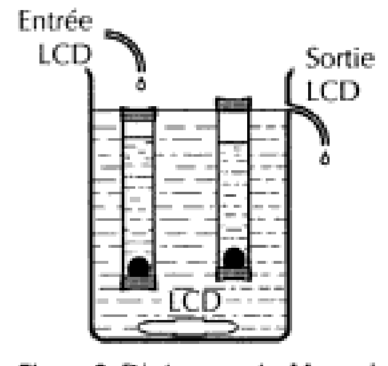


Figure 3. Dialyseur de Monod

Ce boyau, totalement immergé, trempe dans le LCD, qui est continuellement renouvelé et agité. Étant donné la surface de la membrane cylindrique du boyau, le rendement de dialyse est amélioré, par rapport au dialyseur de Graham.

3. Dialyseur à écoulement en film du LCD

L'avantage principal d'un tel dialyseur (*fig. 4*) réside dans l'utilisation d'un faible volume de LCD ainsi que dans l'existence d'une osmose minimale. Ce type de dialyseur possède de nombreuses variantes, mais le principe du contact reste identique quant à l'écoulement en film du LCD sur la membrane. L'inconvénient majeur de ce type de dialyseur est le dessèchement du boyau – et donc le colmatage de la membrane et la modification du diamètre des pores – lorsque le débit du LCD n'est pas suffisant, et que l'atmosphère est sèche. Pour remédier à ce dernier problème, il est nécessaire de laisser un certain volume de liquide (S) au fond de l'enceinte close du dialyseur.

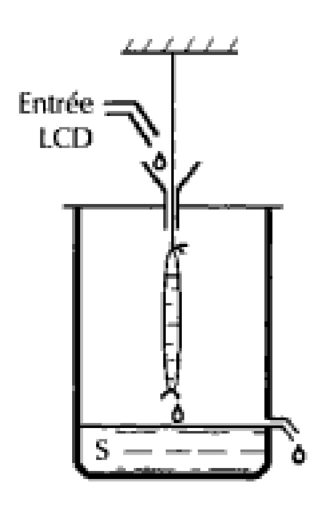


Figure 4. Dialyseur à écoulement en film

4. Dialyseur en flux continu

Voir la *figure 5*.

Les circuits du liquide à dialyser et du LCD correspondent à des canaux de section semi-cylindriques, situés de part et d'autre d'une feuille de membrane de dialyse. Les sens de déplacements des deux liquides peuvent être identiques ou différents (dialyse à contre-courant).

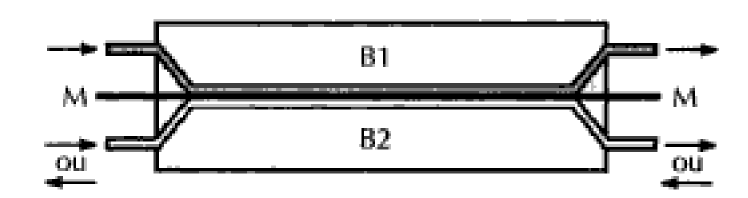


Figure 5. Dialyseur en flux continu

Ce dialyseur permet de traiter des volumes assez importants de solution macromoléculaire, de façon continue, mais avec un rendement très faible. Il y a une vingtaine d'années, ce type de dialyseur était très utilisé sur les auto-analyseurs en flux continu, pour permettre la déprotéinisation des échantillons. Les dosages des espèces diffusibles étaient alors réalisés sur le LCD, malgré le très faible rendement de leurs diffusions.

5. Dialyse de grands volumes de liquide

Cela peut être réalisé grâce à l'utilisation de *fibres creuses* de diamètre interne très faible, de longueur allant de 10 cm à 1 m, et dont la surface spécifique de membrane est très élevée. Les fabricants proposent des fibres ayant des diamètres de pores tels que le seuil de coupure peut être choisi entre 5 000 et 1 000 000.

6. Dialyse de petits volumes de liquide

Pour réaliser la dialyse de petits volumes, de nombreux montages peuvent être utilisés, et l'on peut dire que chaque laboratoire possède sa propre méthodologie. À titre d'exemples, nous citerons :

- l'utilisation d'un petit boyau (diamètre de 6 mm) fermé par un nœud à chaque extrémité, contenant le liquide à dialyser ainsi qu'un petit cylindre de verre plein (diamètre de 5 mm), ce dernier repoussant le liquide à la périphérie, contre la membrane. Cet ensemble est immergé dans un bécher contenant le LCD, agité en permanence ;
- un modèle équivalent est commercialisé, pour des volumes allant de 50 µL à 1 mL. Il s'agit de deux tubes qui s'emboîtent, bloquant une petite pièce de membrane (M) de dialyse (*fig. 6*), entre un tube (T) contenant la solution à dialyser et le milieu extérieur, par un couvercle échancré (C) du côté du LCD ;

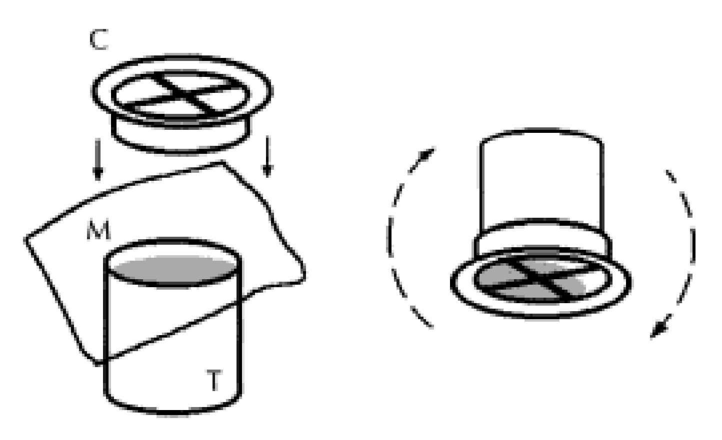


Figure 6. Dialyseur pour petit volume (FastDialyzer®)

- un autre dispositif en cassette (*fig. 7*) consiste en une petite cellule de la forme d'une diapositive possédant deux fenêtres (M) constituées de membranes. L'échantillon est introduit par le canal (E) à l'aide d'une seringue, entre les deux membranes. Un flotteur (F) permet à l'ensemble de se maintenir en position verticale dans le récipient contenant le LCD. La récupération du rétentat est réalisée par le canal (E), après retournement du dispositif. Les volumes utilisables vont de 0,1 mL à 15 mL, selon le modèle de cassette, et le taux de récupération est voisin de 95-98 %.

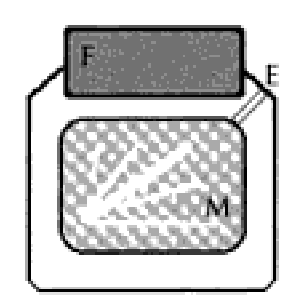


Figure 7. Dialyseur en cassette (Slide-A-Lyzer®)

- un très petit volume de liquide à dialyser (quelques centaines de microlitres) peut être déposé directement, sous forme de grosse goutte, sur une petite pièce de membrane de dialyse, cette dernière flottant à la surface du LCD, remplissant un récipient.

7. Dialyse inverse

Cette méthode sert à concentrer une solution protéique.

Une technique simple utilise une solution macromoléculaire concentrée de polyéthylène glycol (PEG, masse molaire 35 000 à 40 000). Dans ce cas est mis à profit le

IV. Osmose inverse

A. Principe

L'osmose inverse (OI) (*fig. 11*), ou hyperfiltration, est utilisée pour extraire l'eau d'une solution chargée en ions, en lui faisant traverser une membrane, sous une pression de valeur supérieure à la pression osmotique (Π). L'eau pure passe à travers cette membrane, de la solution la plus concentrée en espèces dissoutes, vers le second compartiment, pour former le *perméat*. Le transfert sélectif du solvant par rapport au(x) soluté(s) résulte de la nature et des caractéristiques de la membrane, ainsi que de la différence de pression transmembranaire.
L'osmose inverse est utilisée dans deux buts essentiels :

- la production d'eau potable à partir d'eau de mer, ou d'eau de très haute qualité à partir d'eau prépurifiée. Cette dernière utilisation concerne l'industrie et le domaine pharmaceutique, pour l'obtention d'eau pure, sans bactérie, ni pyrogène ;
- l'augmentation de la concentration en espèces dissoutes d'une solution, en particulier dans l'industrie alimentaire (formation de jus concentrés de fruits, de tomates...), ou dans le traitement des effluents industriels (boues).

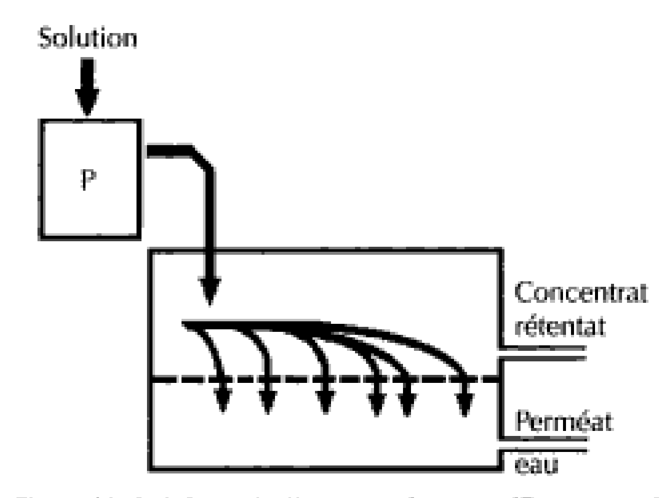


Figure 11. Schéma de l'osmose inverse (P : pompe)

B. Membranes

On utilise des membranes composites, qui sont asymétriques, et dont l'épaisseur de peau est dix à vingt fois inférieure à celle du squelette. Elles sont très sélectives et très perméables, stables dans un large intervalle de pH (2 à 11), et doivent résister à la pression. Elles sont malheureusement souvent sensibles au chlore.
Les matériaux les plus couramment utilisés sont : le polyamide (0,2 µm d'épaisseur de peau) sur polysulfone (160 µm), polyétheramide, polyétherurée, polysulfone ou acétate de cellulose. Ces membranes sont assemblées en modules de type plan-spiralé ou sous forme tubulaire, ou sont à fibres creuses. Le type de module est choisi en fonction du matériel liquide à traiter, pour obtenir un régime d'écoulement acceptable, un volume mort faible, une grande facilité de nettoyage et de stérilisation, ainsi qu'une grande surface spécifique.

Hidden page

C. Applications

Les principales utilisations de l'ultrafiltration concernent :
- la préparation d'échantillons pour l'électrophorèse (concentration),
- le dessalage d'échantillons,
- l'équilibrage en tampon d'un échantillon,
- la déprotéinisation et/ou la concentration d'échantillons biologiques,
- la délipidation d'échantillons biologiques,
- la séparation de classes de macromolécules, d'après leurs masses molaires moléculaires et leurs tailles,
- l'isolement de traces de protéines,
- l'élimination de bactéries, virus, pyrogènes (ultrafiltration stérilisante),
- en biologie moléculaire, la séparation de fragments de restriction…

Conclusion

Les techniques qui utilisent des membranes semi-perméables ont évolué très rapidement, grâce à la mise au point – tant pour l'hémodialyse que pour la biologie – de matériaux modernes et efficaces. Les méthodologies afférentes ont connu un essor tout aussi considérable, et les applications sont très nombreuses en médecine, en biologie, en chimie, ainsi que dans les industries chimique et alimentaire…

L'essentiel de la question

Domaine d'utilisation des membranes : macrofiltration, microfiltration, ultrafiltration, osmose inverse, dialyse.
Les membranes semi-perméables :
- dérivés de la cellulose ;
- membranes organiques.

La dialyse :
- diffusion lente (loi exponentielle), associée à osmose ;
- appareillages : Graham, Monod, film liquide, flux continu, fibres creuses, dispositifs pour petits volumes ;
- la dialyse inverse ;
- la dialyse à l'équilibre ;
- applications : biologie, hémodialyse.

L'osmose inverse :
- membrane et pression supérieure à pression osmotique ;
- purification des eaux ;
- les eaux de types : primaire, qualité 3, qualité 2, qualité 1 ou ultra-pure.

L'électrodialyse :
- membranes et champs électriques ;
- purification des eaux ;
- membranes ioniques (cationiques et anioniques) définissant des compartiments.

L'ultrafiltration :
- membranes et pression positive ou négative ;
- membranes permsélectives : séparation de molécules dissoutes selon leurs tailles (masses molaires moléculaires) ;
- utilisation aisée ;
- applications : déprotéinisation, délipidation, dessalage d'échantillons ; séparation de classes de tailles de grosses molécules ; isolement (fragments de restriction).

Pour en savoir plus :

- Audinos R. L'électrodialyse. Techniques de l'ingénieur ; P 1825 : 1-12.
- Brun J.-P. *Procédés de séparation par membranes*. Masson, 1989.
- Maurel A. Osmose inverse et ultrafiltration. Techniques de l'ingénieur ; J 2796 : 1-16 et J 2797 : 1-14.
- Maurel A. Techniques séparatives à membranes : considérations théoriques. Techniques de l'ingénieur ; J 2790 : 1-24.
- Pastor J., Pauli A.-M. La dialyse. Techniques de l'ingénieur ; P 1525 : 1-10.

Une extraction correspond au transfert d'un composé (soluté) du milieu dans lequel il se trouve, vers un second milieu, en vue de son isolement.
Lorsque l'échantillon est un liquide contenant le soluté, le passage de ce soluté d'un milieu liquide à un autre milieu liquide non miscible au premier correspond à une extraction liquide-liquide. Le passage d'un milieu liquide à un milieu solide est nommé « extraction liquide-solide » ou « extraction par un solide », ou « solid-phase extraction » (SPE) en anglais.
Lorsque l'échantillon est un solide, l'extraction utilise un solvant qui réalise une dissolution fractionnée. Le soluté passe du milieu solide au milieu liquide d'extraction.

I. Rappels

A. Polarité

Du fait de sa constitution et de sa symétrie, une chaîne hydrocarbonée possède un caractère *apolaire*. Les molécules organiques possédant une telle structure de base (tels que les hydrocarbures saturés : pentane, hexane, etc.) sont des molécules dites *apolaires*.
Une molécule organique a un caractère *polaire* quand elle possède un moment dipolaire créé par sa configuration dissymétrique et une non-superposition des sites (pôles) positif et négatif. Ce caractère polaire existe pour les molécules qui possèdent un ou plusieurs hétéro-atomes, conférant donc à la molécule à la fois une dissymétrie et la création de « pôles » de charges opposées. Les molécules azotées et oxygénées possèdent ce caractère de molécules polaires. Les molécules halogénées sont moins polaires.

B. Solubilité

Le vieil adage « qui se ressemble s'assemble » peut être utilisé pour simplifier l'explication de la solubilisation d'une molécule dans un solvant donné : un solvant polaire solubilisera un soluté polaire, un solvant apolaire dissoudra un soluté apolaire. En effet, les relations entre soluté et solvant reposent sur la formation de liaisons hydrogène ainsi que sur les interactions de Van der Waals.
Pour la liaison hydrogène, il est nécessaire de disposer d'un atome d'hydrogène terminal d'une fonction, ainsi que d'un doublet libre d'un hétéro-atome (N, O ou halogène) sur les molécules du solvant et du soluté.
En biologie, comme les solutés à extraire sont solubilisés dans l'eau (plasma), le solvant d'extraction sera souvent moins polaire. Or, les molécules qui possèdent une forte affinité pour les solvants peu polaires (dits communément : phases organiques, par opposition à l'eau) ont une charge faible ou nulle, une grande longueur de chaîne hydrocarbonée, peu ou pas de groupement fonctionnel à hétéro-atome.

Tableau 2. Solvants non miscibles à l'eau, classés par ordre croissant de polarité. À titre indicatif, les solvants les plus polaires sont l'éthanol (polarité = 0,88), le méthanol (0,95), l'éthylène glycol (1,11) et l'eau (polarité maximale)

Nom	Polarité	Densité
N-pentane	0,00	0,626
Hexane	0,00	0,659
Heptane	0,01	0,674
Iso-octane	0,01	0,692
Cyclohexane	0,04	0,779
CCl_4	0,18	1,594
O-xylène	0,26	0,897
Éther isopropylique	0,28	0,724
Toluène	0,29	0,867
Benzène	0,32	0,879
Éther éthylique	0,38	0,713
$CHCl_3$	0,40	1,492
CH_2Cl_2	0,42	1,335
N-butanol	0,42	0,810
Dichloroéthane	0,49	1,256
Méthyl éthyl cétone	0,51	0,805
Acétate d'éthyle	0,58	0,901

E. Recul d'ionisation

Certains solutés (molécules biologiques ou médicamenteuses) possèdent des groupements fonctionnels donneurs de protons (–COOH, $-SO_3H$, phénol) ou accepteurs de protons (amines). De ce fait, ces molécules se comportent comme des acides faibles ou des bases faibles, dont les forces sont exprimées par leurs pKa. L'addition d'acide ou de base à un de ces solutés entraîne donc une modification de son ionisation. La diminution de cette ionisation, appelée « recul d'ionisation », est d'une très grande importance en biologie, car cela conditionne le choix du pH optimum de la solution contenant l'échantillon et/ou de la phase extractive. À titre d'exemple, une molécule possédant une fonction amine primaire se comporte comme une molécule neutre pour un pH du milieu fixé à une valeur supérieure à son pKa ; elle possède alors une plus grande solubilité dans les solvants organiques. Pour ce faire, on fixe le pH à une valeur au moins égale à (pKa + 2). De façon inverse, le choix d'un pH inférieur au pKa conditionne l'acceptation d'un proton par cette molécule ; elle se comporte alors comme un cation, soluble dans les solvants polaires.

Une extraction peut être réalisée sur tout matériau et sur tout type de prélèvement. En biologie, il est courant de travailler sur des prélèvements liquides : sang, urine, liquide céphalorachidien, liquide gastrique ou duodénal, bile, liquides d'épanchements (ascite, liquide pleural), liquide synovial, sueur, etc. Comme les biopsies sont de plus en plus souvent réalisées, les échantillons solides ne sont pas chose rare (tissus cellulaires, calculs), et les substances qu'ils contiennent peuvent faire l'objet d'études chimiques, biochimiques ou pharmacologiques.
Nous traitons ci-après les méthodes d'extraction qui s'adressent essentiellement aux échantillons liquides.

II. Méthodes appliquées aux échantillons liquides

A. Extraction liquide-liquide

Ce type d'extraction utilise deux milieux liquides non miscibles : celui qui contient le soluté (noté par l'indice A, et qui après équilibre de partage – ou équilibre de distribution – sera nommé *raffinat*) et le solvant d'extraction (indice B, appelé *extrait*). À l'équilibre, lorsque le soluté s'est distribué entre les deux liquides, on considère que l'on a réalisé une extraction simple, dite « à un étage ». Une extraction simple de ce type est réalisée par mise en contact de la solution du soluté avec un certain volume de solvant non miscible, agitation vigoureuse puis décantation et séparation des deux phases liquides, en ampoule à décanter ou par centrifugation.
Une extraction peut être réalisée :

- par simple partage (distribution) du soluté entre les deux milieux liquides, à un seul ou à plusieurs étages ;
- ou après formation de complexes extractibles, ceux-ci pouvant être :
  - des agrégats d'ions,
  - ou des complexes moléculaires.

1. Considérations quantitatives de l'extraction simple

L'extraction simple consiste en la mise en présence du milieu liquide contenant le soluté et du milieu liquide d'extraction. Une agitation vigoureuse permet la distribution efficace du soluté dans les deux phases, puis une décantation permet la séparation des deux phases liquides non miscibles.

a) Distribution régulière du soluté

On entend par distribution régulière le partage du soluté dans les deux phases liquides sans modification de sa structure moléculaire, quelle que soit sa concentration initiale.
Soit une quantité initiale de soluté : Q_{A0} dans un volume V_A de solvant A.

Le rendement (R) d'une extraction simple est défini par le rapport de la quantité de soluté extraite (Q_B) par le solvant B, comparativement à sa quantité initiale (Q_{A0}) dans le solvant A :

$$R = \frac{Q_B}{Q_{A0}} \quad (5)$$

avec :

$$\frac{Q_B}{Q_{A0}} = \frac{Q_B}{Q_A + Q_B} = \frac{1}{\frac{Q_A}{Q_B} + 1}$$

ou :

$$R = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \left(1 - \frac{1}{1+\alpha}\right) \quad (6)$$

L'équation 6 montre que, quelle que soit la valeur de α, le rendement est toujours inférieur à 100 %, cela signifiant qu'une certaine quantité (même faible) de soluté Q_A reste dans le solvant A.
Ces expressions ne sont valables que si le soluté se distribue de façon régulière entre les deux phases liquides A et B, quelles que soient les concentrations, et lorsque les volumes V_A et V_B sont peu différents.
Cette distribution fait apparaître la concentration C_B de soluté dans le solvant B :

$$C_B = C_{A0} \cdot \left(\frac{\lambda}{1+\alpha}\right) \quad (7)$$

et la quantité de soluté :

$$Q_B = Q_{A0} \cdot \left(\frac{\alpha}{1+\alpha}\right) \quad (8)$$

et la concentration restante dans le solvant A :

$$C_A = C_{A0} \cdot \left(\frac{1}{1+\alpha}\right) \quad (9)$$

avec :

$$Q_A = Q_{A0} \cdot \left(\frac{1}{1+\alpha}\right) \quad (10)$$

Dans la représentation graphique de la distribution régulière du soluté (*i.e.* lorsque le soluté ne subit pas de modification structurale ou fonctionnelle, en se dissolvant dans la nouvelle phase B) il est à noter que pour une concentration initiale de soluté C_{A0} (*fig. 2A*), un coefficient de partage λ et un choix de volumes des phases V_A et V_B, sont obtenues les concentrations C_B dans l'extrait, et C_A dans le raffinat. Or, une augmentation du volume V_B par rapport à V_A, permet de diminuer la pente du segment EF, et donc de minimiser la concentration résiduelle C_A du soluté dans la phase A. De ce fait, C_B diminue aussi, mais seulement par augmentation du volume de la phase B. Mais alors, Q_B augmente.
En conclusion, le choix du solvant d'extraction et de son volume V_B sont des facteurs essentiels, car ils conditionnent la valeur du coefficient de partage λ, ainsi que le rendement d'extraction.

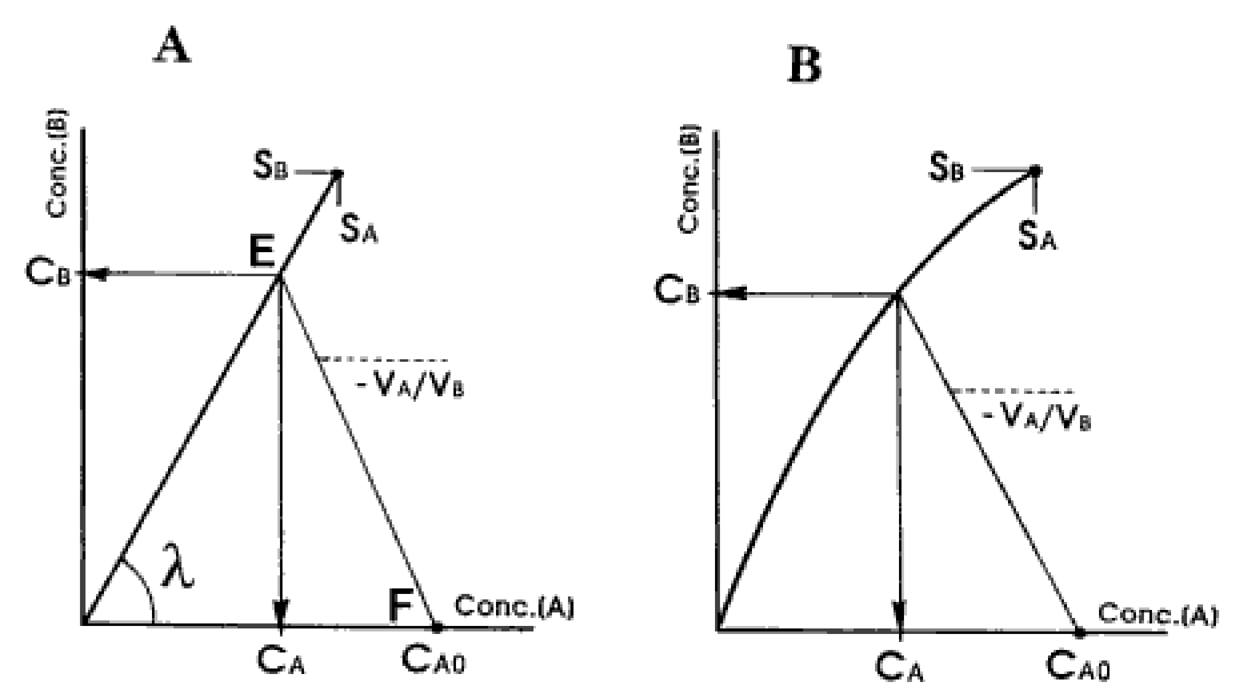


Figure 2. Les modes de distribution du soluté : distribution régulière (A) et non régulière (B)

b) Distribution non régulière du soluté

Lorsque le soluté est modifié par les conditions expérimentales (exemple : obtention d'une forme salifiée, à un pH donné), ce soluté se distribue dans les deux phases sous sa forme initiale (f.i.) ainsi que sous forme salifiée (sal). Le solvant le plus polaire contient alors majoritairement la forme salifiée. Dans ces conditions, il n'est pas possible de tenir compte du coefficient de partage λ, mais du *taux de distribution* D :

$$D = \frac{C_{f.i.B}}{C_{f.i.A} + C_{sal.A}} \qquad (11)$$

Or, D n'est pas nécessairement une constante, ce qui se traduit par une loi non linéaire de la distribution (*fig. 2B*).
En effet, pour une concentration initiale en soluté C_{A0}, la distribution fait apparaître les concentrations C_A et C_B après équilibre. De la même manière que pour une distribution régulière, une augmentation de volume de la phase extractive améliore le rendement d'extraction.

■ ***Distribution non régulière d'un soluté à comportement acide***

Soit le soluté à caractère acide HA, dont la dissociation en solution aqueuse peut s'écrire :

$$HA + H_2O \leftrightarrow A^- + H_3O^+$$

et dont la constante d'équilibre (constante de dissociation acide) Ka est exprimée par :

$$Ka = \frac{[A^-]_{eau} \cdot [H_3O^+]_{eau}}{[HA]_{eau}} \quad \text{ou} \quad Ka = \frac{[A^-]_A \cdot [H_3O^+]_A}{[HA]_A} \qquad (12)$$

Cet acide existe sous la forme HA dans le solvant d'extraction à la concentration $[HA]_B$, ainsi que dans le solvant initial, à la concentration $[HA]_A$.



Le rendement global de ces deux étages correspond à :

$$R_2 = \frac{\Sigma Q_B}{Q_{A0}}$$

soit :

$$R_2 = \alpha \cdot \left[\frac{1}{(1+\alpha)^1} + \frac{1}{(1+\alpha)^2}\right] \quad (29)$$

Une démonstration équivalente permet de calculer le rendement d'une extraction à (n) étages, utilisant le même solvant et les mêmes volumes :

soit :

$$R_n = \alpha \cdot \left[\frac{1}{(1+\alpha)^1} + \frac{1}{(1+\alpha)^2} + \frac{1}{(1+\alpha)^3} + \cdots + \frac{1}{(1+\alpha)^n}\right] \quad (30)$$

ou :

$$R_n = 1 - \frac{1}{(1+\alpha)^n} = 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{\lambda}{n} \cdot \frac{Vt_B}{V_A}\right)^n} \quad (31)$$

avec le volume total de solvant B utilisé (Vt_B), en n extractions successives avec des volumes égaux de solvant B : $Vt_B = n.V_B$.

Une autre approche de l'extraction multiple peut être réalisée, par l'utilisation d'un abaque, connaissant les coefficients de partage ainsi que les volumes des phases liquides. Ce mode graphique permet de prévoir le nombre d'étages à réaliser en vue d'obtenir le rendement souhaité. Un exemple de ce type d'abaque est représenté à la *figure 3*.

En simplifiant, on peut dire que l'ordonnée correspond au rendement d'extraction (échelle logarithmique) et l'abscisse : au coefficient de partage relatif aux quantités α (échelle log.) ou au nombre d'étages (n).

Par exemple, une seule extraction d'un soluté ayant un coefficient de partage $\lambda = 2$, utilisant un volume de solvant d'extraction ($Vt_B = 30$ mL) pour 10 mL d'échantillon (donc pour $(V_B/V_A) = 3$), (entraînant $\alpha = 6$), permet d'obtenir un rendement d'extraction égal à 86 % (point R1).

Une extraction à deux étages (n = 2), utilisant deux fois 15 mL de solvant d'extraction, permet d'atteindre un rendement de 93,8 % (point R2).

Une triple extraction (n = 3), utilisant trois fois 10 mL de solvant, donne un rendement d'extraction de 96,3 % (point R3).

Le rendement de l'extraction multiple dépend donc du nombre d'étages, ainsi que des valeurs des fractions volumiques des deux phases liquides.

Mais, l'inconvénient majeur de l'extraction multiple est l'utilisation de (n) volumes de solvant d'extraction, sachant que chacun de ces volumes extrait de moins en moins de soluté, bien que le rendement global de l'extraction augmente. De plus, ces (n) étages nécessitent (n) décantations, souvent laborieuses, car la formation d'émulsions n'est pas un fait rare.

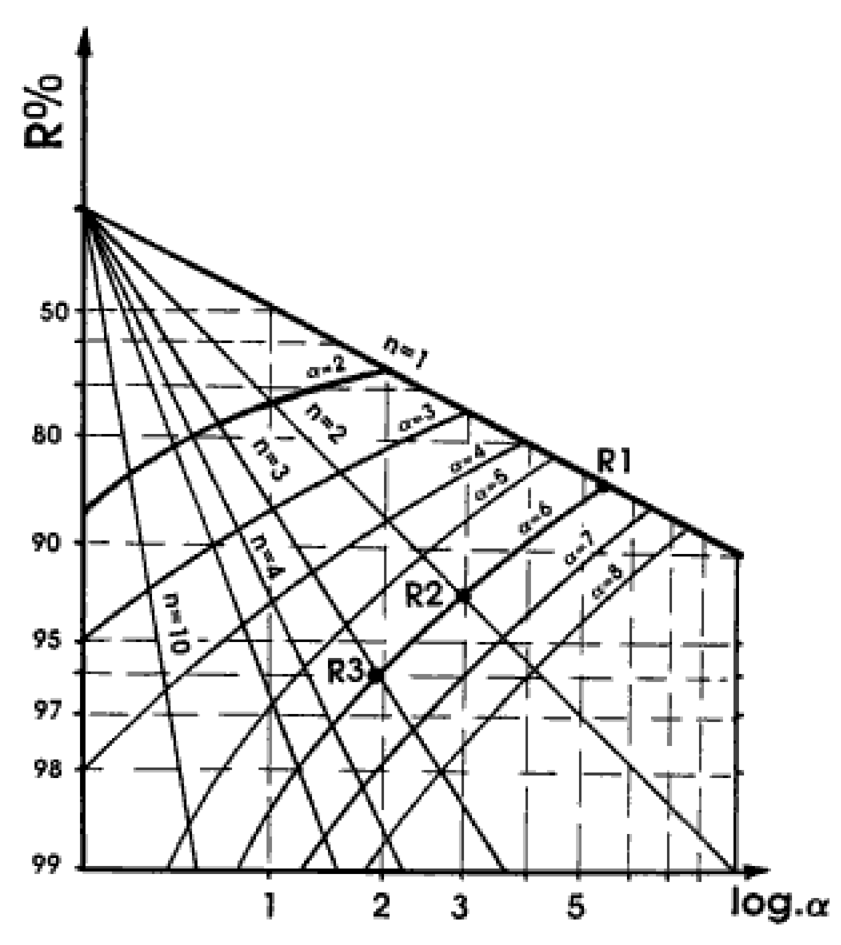


Figure 3. Exemple d'abaque pour la détermination des rendements d'extraction

3. Extraction à contre-courant

L'extraction à contre-courant a pour but de résoudre les problèmes cités précédemment, en utilisant au maximum les capacités de solubilisation du solvant d'extraction.

En effet, la phase liquide, qui contient le soluté, ainsi que le solvant d'extraction circulent en sens inverses, de façon continue. Les recyclages constants du solvant d'extraction et de la phase liquide échantillon, permettent à ces liquides d'échanger du soluté en continu, et en particulier de permettre à tout volume unitaire de solvant d'extraction de se charger en ce soluté.

On utilise trois types d'appareils d'extraction liquide-liquide :

- les mélangeurs-décanteurs constitués d'une chambre de mélange suivie d'une chambre de décantation ;
- les extracteurs-colonnes dans lesquels la phase lourde est introduite par le haut, et dont la mobilité est due à la gravité et à sa forte densité, alors que la phase légère (de faible densité) circule de bas en haut, par phénomène de flottation ;
- les extracteurs centrifuges qui peuvent être de deux types : à étage (mélangeur et décanteur étant regroupés) ou différentiels continus (les phases circulent à contre-courant dans des dispositifs de garnissages de formes variées).

La *figure 4* représente le schéma théorique d'un tel extracteur centrifuge à contre-courant. Si l'on utilise une solution aqueuse de soluté et une phase organique d'extraction ($CHCl_3$, par exemple), la première phase (de faible densité) est introduite par El, sa sortie se faisant en Sl ; la phase organique est introduite en EL, et sa sortie est réalisée en SL. L'intervalle BC, entre les deux entrées de liquides, est

a) Hormonologie

L'extraction liquide-liquide est appliquée :

- aux 17 cétostéroïdes urinaires, qui après hydrolyse acide, sont extraits par le dichlorométhane, avant la réaction de Zimmerman ;
- aux 17 hydroxy-stéroïdes urinaires, qui après hydrolyse enzymatique, sont extraits par le chloroforme, avant la réaction de Porter et Silber ;
- aux 17 céto et hydroxy-stéroïdes urinaires, traités par l'acétate d'éthyle, avant leur séparation par CPG ;
- aux œstrogènes, prégnandiol et prégnanetriol urinaires, qui subissent une hydrolyse enzymatique, une extraction par le mélange de Jayle (acétate d'éthyle + hexane + éthanol), en vue d'une séparation par CPG.

b) Biochimie

Du fait de la lourdeur des extractions liquide-liquide, de très nombreuses méthodes actuelles de dosages ont été mises au point, abolissant les étapes de ces extractions. À titre historique, on peut citer des dosages qui nécessitaient des extractions obligatoires :

- le dosage du cholestérol plasmatique par la réaction de Libermann, après extraction chloroformique,
- le dosage des acides gras libres sériques, après extraction par le mélange (isopropanol-heptane : 80-20 %), avant d'être dosés par l'hydroxyde de sodium,
- le dosage des triglycérides sériques, extraits par le mélange : isopropanol-heptane (66-34 %),
- l'acide 5-OH-indolacétique de l'urine, dosé par colorimétrie après extraction par l'acétate d'éthyle, suivie d'une seconde extraction par l'heptane,
- l'acide vanilmandélique urinaire extrait par l'acétate d'éthyle à pH = 1, et oxydé en vanilline, extraite à son tour par le toluène,
- la protoporphyrine libre des hématies, après extraction par l'acétate d'éthyle, en milieu acétique.

c) Toxicologie

Les recherches rapides de toxiques sont toujours effectuées sur des extraits.

Le dosage spectrophotométrique des barbituriques du sang total : une extraction par le dichlorométhane ou le chloroforme, est suivie d'une mesure d'absorbances à deux pH différents (méthode de Bourdon et Yonger).

d) Pharmacologie

Les études spectrales d'identification et de dosage des molécules médicamenteuses et de leurs métabolites, sont réalisées sur le sérum ou (et) les urines, après extraction par solvants organiques, avec obligation dans de nombreux cas de réaliser un recul d'ionisation.

e) Pharmacie industrielle

La purification de certains alcaloïdes qui, sous forme basique, sont organosolubles.

La pénicilline des milieux de culture à grande échelle, qui en milieu acide (pH voisin de 2), est extraite par l'acétate d'amyle, dans un premier temps. Puis à pH = 7, elle est à nouveau extraite par une solution aqueuse.

f) Chimie

De nombreuses molécules sont extraites de leur milieu aqueux par un solvant organique, après création d'entités extractibles complexes :
- par formation d'agrégats d'ions neutres : cas des ions métalliques associés à des anions minéraux ou organiques (picrate, tétraphényl-borate) ; cas des tensioactifs anioniques (laurylsulfate de sodium) permettant la formation de paires d'ions ;
- par formation de complexes moléculaires :
  - pour les cations métalliques, avec les acides carboxyliques,
  - pour les cations métalliques, formant des chélates organo-minéraux neutres, avec des réactifs tels les béta-dicétones, les oximes, les dithiocarbamates.

B. Extraction liquide-solide

Dans la littérature, ce type d'extraction porte divers noms : « extraction liquide-solide » ou ELS, « solid phase extraction » (SPE), ou encore : « liquid solid extraction » (LSE).
Depuis 1978, ce procédé d'extraction est de plus en plus utilisé. Il s'applique à l'étude de composés très divers : analytes biologiques, médicaments et métabolites, toxiques, polluants, etc.

1. Principe de base

Une extraction liquide-solide se déroule en deux étapes. Une première étape consiste en un passage d'un soluté (ou de solutés) d'un milieu liquide à un milieu solide, ce dernier ayant pour finalité de retenir ce ou ces solutés. La seconde étape consiste en une élution du soluté d'intérêt, par un solvant approprié, permettant de rompre les interactions soluté-matrice solide. La « fixation » du soluté doit donc être réversible. Les interactions entre la phase solide et les solutés sont des interactions de type Van der Waals, électrostatiques, ou du type liaison hydrogène.

2. Qualités de la méthode, par rapport à l'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide a pour inconvénients :
- de nécessiter des volumes importants de solvants, donc d'un coût élevé,
- de donner des extraits dilués,
- de former des émulsions, quelquefois difficiles à rompre,
- d'utiliser un matériel cher : verrerie, évaporateur, etc.,
- d'être longue, fastidieuse,
- d'utiliser obligatoirement des solvants non miscibles et donc de polarités inadéquates.

L'extraction liquide-solide ne montre que des avantages. En effet, elle utilise une surface solide (très souvent une silice poreuse, sur laquelle des groupements fonc-

tionnels sont greffés), tolérant une large gamme de solvants, y compris l'eau et le méthanol. Cette extraction est réalisée en une seule manipulation. La nature et le volume de solvant de « désorption » conditionnent le rendement d'extraction. L'extraction liquide-solide est une technique rapide, permettant aussi l'enrichissement en soluté. De ce fait, elle peut être utilisée en analyse des traces. La seule critique relative à l'extraction liquide-solide concerne le prix élevé des cartouches ou disques ; mais ce coût est très relatif, car l'extraction liquide-solide permet des économies importantes de solvant, de temps de manipulation et de charges en personnel.

3. Phases solides

Les phases solides sont conditionnées sous forme de poudre irrégulière, enserrée entre deux frittés de polyéthylène, de Téflon®, d'acier inoxydable ou de verre. Les phases solides les plus utilisées furent initialement celles qui permettaient le phénomène d'adsorption : la silice, l'alumine et le silicate de magnésium hydraté (Florisil®). Puis, l'évolution des techniques de greffages chimiques a permis d'obtenir un grand nombre de phases actives, à polarités très diverses et contrôlées. Actuellement, les solides à phase apolaire greffée permettent l'extraction et la purification d'analytes de polarité intermédiaire, par échange à polarité de phase inversée. Le procédé par échange d'ions est aussi utilisé.

De très nombreux fournisseurs proposent actuellement un choix important de phases solides conditionnées en cartouche, en seringue, en disque, en plaque de 96 puits ou même dans des embouts de pipettes automatiques.

Parmi les phases solides polaires, il faut citer : l'alumine, la silice, les silices modifiées par greffage (aminopropyl, diéthylamino, etc.).

Le Florisil® représente une phase de polarité moyenne, très utilisée.

Les silices greffées correspondent aux mêmes matériaux que ceux qui sont utilisés en CLHP, couvrant tous les domaines de polarité. Les phases solides apolaires sont représentées par les C2-, C8-, cyclohexyl-, phényl-, cyanopropyl-, diol-, et C18- silices. Ces diverses phases solides tolèrent un intervalle de pH compris entre 2 et 8.

Il existe aussi des phases solides échangeuses d'ions, dont des dérivés ammoniums quaternaires, ou acide benzène sulfonique.

4. Protocole d'extraction liquide-solide

Tous les débits de liquides doivent être réguliers (0,5 à 20 $mL.min^{-1}$).

La *figure* 5 résume les quatre temps de l'extraction liquide-solide :

- 1re étape : le conditionnement de la phase solide est obligatoire, dans le but de la rincer, l'activer, et enfin de la saturer avec le même solvant que celui qui contient l'échantillon ;
- 2e étape : la rétention. Le passage de la solution échantillon permet la fixation des composés sur la phase solide, dont le soluté d'intérêt ;
- 3e étape : le rinçage. Cette étape correspond – comme en chromatographie sur colonne – à l'élution sélective des composés à éliminer, par l'utilisation de volumes successifs de solvants de polarités croissantes ou décroissantes. Ces solvants de rinçages sont choisis comme non éluants pour le soluté d'intérêt ;

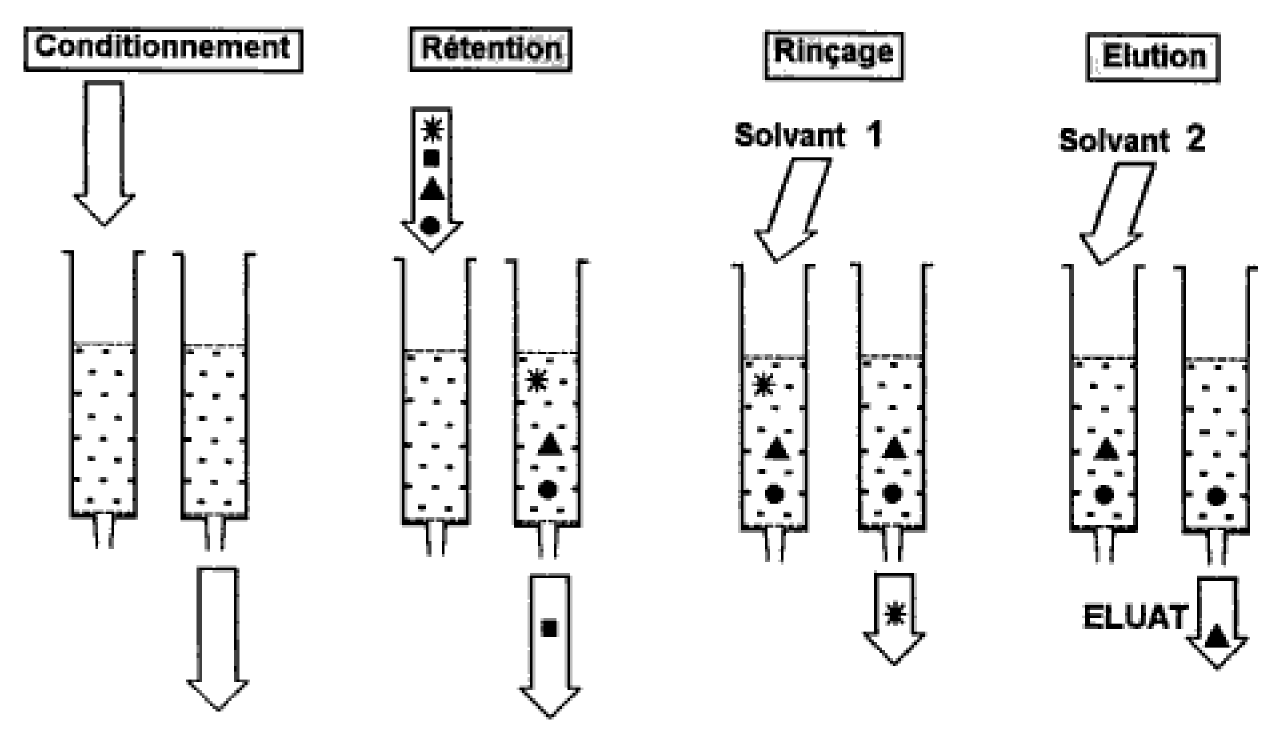


Figure 5. Schéma de principe de l'ELS

- 4[e] étape : l'élution. Suite aux rinçages, est employé le solvant adéquat permettant le « décrochage » du soluté. Un volume minimal de ce solvant peut être employé, permettant ainsi d'obtenir l'élution du soluté, à concentration plus élevée que celle de l'échantillon initial.

Ce dernier fait est très souvent mis à profit pour purifier et enrichir un échantillon. Par exemple, les chimistes responsables de l'analyse des eaux (rivières, effluents, etc.) utilisent très souvent des cartouches, dans lesquelles ils font passer de très grands volumes d'échantillons (jusqu'à plusieurs litres), à des débits faibles (0,3 $mL.min^{-1}$).

La récupération des solutés d'intérêt est alors réalisée par quelques millilitres de solvant, ce dernier étant choisi pour extraire une classe définie de ces composés.

Un autre avantage de cette technique réside dans le fait que l'échantillon peut être traité sur le lieu de prélèvement (écologie, criminalistique, etc.), jusqu'à l'étape de rétention. La cartouche peut alors être transportée à l'état sec au laboratoire, en vue des étapes de rinçage et d'élution.

Actuellement, les extractions liquide-liquide sont de plus en plus remplacées par des extractions liquide-solide, en vue de la préparation d'échantillons biologiques. Pour des séries d'analyses, des extractions sont réalisées en séries, et pour ce faire, les fabricants d'appareillages ont mis au point des automates d'extraction. Ces appareils utilisent des cartouches, des disques ou des plaques de 96 puits, et ils sont robotisés pour les diverses étapes de l'extraction : conditionnement, dépôts d'échantillons, rinçages et élutions.

5. Applications

Aujourd'hui, l'extraction liquide-solide correspond à la méthode de choix pour préparer les échantillons en vue d'une analyse ultérieure, que celle-ci soit chromatographique ou spectroscopique.

Ces fibres sont réutilisables, et elles permettent 50 à 100 extractions, après reconditionnement par chauffage ou par lavage à l'aide d'un solvant (l'hexane est à proscrire pour les fibres PDMS).
L'automatisation de la technique est possible, en utilisant un échantillonneur spécifique, en particulier en CPG.
La manipulation de l'appareil à micro-extraction en phase solide consiste tout d'abord à laisser la fibre à l'abri dans son aiguille protectrice, cette dernière ayant une résistance mécanique suffisante pour permettre le perçage du bouchon du flacon contenant l'échantillon.
Une pression sur le poussoir permet la sortie de la fibre, qui peut alors baigner dans les vapeurs (de gaz) ou dans le liquide contenant l'échantillon. Les composés d'intérêt peuvent alors imprégner la phase d'adsorption, présente sur le capillaire. Une agitation de l'échantillon et un chauffage favorisent la fixation des solutés.
Après trois à quinze minutes de contact, l'équilibre d'adsorption (ou de partage) est atteint. La fibre est alors rétractée dans son aiguille protectrice, puis l'ensemble est séparé du flacon.
Pour une analyse par CPG, le dispositif est introduit directement à travers le septum de l'injecteur, capillaire rétracté. Puis, la fibre est sortie pendant une à deux minutes, pour permettre la désorption thermique des solutés. La température du bloc-injecteur doit être supérieure au point d'ébullition du composé le moins volatil du mélange, mais la température de la colonne doit être de 20 à 30 °C inférieure à la température d'ébullition du composé le plus volatil. Les composés sont alors piégés en tête de colonne, par le phénomène de *focalisation cryogénique*.

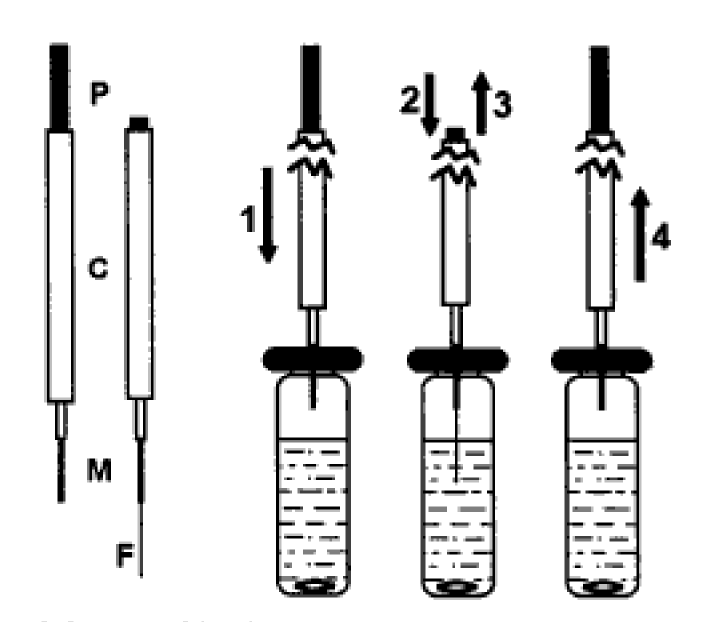


Figure 6. Dispositif à micro-extraction en phase solide (MEPS)

Pour une analyse par CLHP, un injecteur spécial – dit « chambre de désorption » – permet dans un premier temps l'introduction de la fibre (position « chargement »), et secondairement le rinçage de la fibre par la phase mobile, en position « injection ».

2. Phases utilisées

En raison de la mise au point récente de cette technologie, peu de phases d'imprégnation de la fibre sont commercialisées. Certaines phases sont greffées, d'autres seulement adsorbées et d'autres sont partiellement réticulées.

Les polymères utilisés sont :

- le polydiméthylsiloxane (PDMS), d'épaisseur de 7 ou 100 μm,
- le PDMS-divinylbenzène (PDMS-DVB), sous 65 μm,
- le polyacrylate PA (85 μm),
- le carbowax-DVB (65 μm),
- le Carboxène®-PDMS (75 μm) (carboxène : un tamis moléculaire à base de carbone),
- le DVB-Carboxène®.

La phase DVB est partiellement réticulée. Ces phases sont quelquefois associées à des réactifs spécifiques, permettant en une seule étape l'extraction et la dérivation des solutés, en vue d'une analyse par CPG.

3. Domaines d'utilisations

Le type de phase, et donc de fibre imprégnée, est choisi en fonction des composés à extraire :

- les composés volatils nécessitent le PDMS à forte épaisseur (100 μm),
- les gaz et traces de composés volatils : PDMS-carboxène (75 μm),
- les composés moyennement volatils : PDMS à faible épaisseur,
- les composés très polaires : le polyacrylate,
- les composés polaires volatils (alcools, amines) : PDMS-DVB, permettant une très bonne adsorption et un excellent relargage (très utilisée pour la CLHP),
- pour un usage général (molécules à courte chaîne, jusqu'à C18) : DVB-carboxène.

Comparativement aux autres techniques de préparation d'échantillons, la MEPS possède une limite de détection beaucoup plus faible, une bonne linéarité de réponse ainsi qu'une excellente reproductibilité (10-50 % pour l'extraction Liq.-Liq. ; 5-20 % pour l'EPS ; 0,5-10 % pour la MEPS). Les concentrations en solutés des solutions étudiées peuvent être de l'ordre du ppt (1 ng.L^{-1}).

4. Applications

De très nombreuses molécules gazeuses ou en solution sont extractibles et concentrables par cette technique. Ont été décrites les extractions concernant :

- les amines (à chaîne courte) et les nitrosamines : PDMS-DVB,
- les aromatiques dans l'eau (dont les composés explosifs) : PDMS-DVB,
- les terpènes : PDMS,
- cocaïne, amphétamines, antidépresseurs tricycliques, dans l'urine : PDMS,
- les composés volatils (arômes, parfums, additifs alimentaires) : PDMS,
- les polluants (en écologie) :
  - pesticides chlorés : PDMS,
  - herbicides : polyacrylate,
  - organophosphorés : PDMS,

En revanche, pour une solution de saccharose 0,30 mol·l^{-1}, le coefficient osmotique étant 1,014 (le soluté restant sous forme moléculaire), le nombre de milliosmoles peut être considéré équivalent au nombre de millimoles.
Donc, des solutions isomolaires ne sont pas iso-osmotiques.

B. Expression de la concentration osmolaire

La concentration osmolaire peut être exprimée en terme « d'osmolarité » et « d'osmolalité » :

- si la solution est simple, par exemple une solution pure de chlorure de sodium, la différence entre les valeurs d'osmolarité et d'osmolalité est si faible qu'on les considère comme interchangeables ;
- si la solution est complexe, il faut tenir compte du volume occupé par les substances dissoutes. En particulier dans le plasma sanguin, une partie du volume est occupée par des colloïdes comme les protéines : il en découle que la différence entre l'osmolarité et l'osmolalité n'est pas négligeable. L'osmolalité est alors plus élevée que l'osmolarité du fait de la moindre quantité d'eau. Par exemple, pour un plasma normal, l'eau représente environ 930 mL, tenant compte du volume occupé par l'ensemble des analytes en particulier les protéines. L'osmolalité se calcule à partir de l'osmolarité en divisant la valeur de cette dernière par un facteur de 0,93.

L'osmolalité est donc importante en biologie : en effet, elle exprime la concentration de particules exerçant un pouvoir osmotique réel par rapport aux molécules d'eau. La valeur du nombre de mosm rapportée au kg d'eau pure permet de comparer des solutions à teneurs en protéines très différentes, qui sont séparées par des membranes biologiques. C'est le cas en particulier du plasma et des urines : l'expression du rapport de l'osmolalité urinaire à l'osmolalité plasmatique est utilisée pour l'étude de l'excrétion rénale de l'eau.

C. Osmolalité efficace et tonicité

Si l'on considère deux compartiments contenant de l'eau et séparés par une membrane, un soluté versé dans un des compartiments n'exerce un effet osmotique que si les particules demeurent dans ce compartiment. Ce soluté a donc une osmolalité efficace. Au contraire, si le soluté mis dans un des compartiments diffuse facilement à travers la membrane, l'osmolalité efficace s'annule rapidement. L'osmolalité efficace dépend donc de la taille de la particule et de la perméabilité de la membrane.
En biologie, le terme de tonicité se rapporte à l'osmolalité efficace d'une solution. Une solution est dite isotonique, hypotonique ou hypertonique si son osmolalité efficace est équivalente, inférieure ou supérieure à celle du plasma sanguin. Ainsi, une solution de chlorure de sodium isotonique doit avoir une osmolalité proche de 285 mosm·kg^{-1} : on obtient cette activité osmotique en préparant une solution contenant 153,56 mmoles de NaCl (soit 9 g) dans 1 kg d'eau :

$$153{,}56 \cdot (2 \times 0{,}928) = 285 \text{ mosm} \cdot \text{kg}^{-1}$$

phase vapeur : un nouvel équilibre liquide-vapeur s'établit, avec une valeur de tension de vapeur de la solution inférieure à celle du solvant pur. L'abaissement de tension de vapeur est lié directement au nombre de moles de solutés présents dans la solution.

- La présence de solutés conduit aussi à un point de congélation de la solution inférieur à celui du solvant pur. Lors de la solidification d'une solution, le solvant cristallise le premier alors que les solutés restent encore en solution : leurs concentrations dans la solution restante augmentent, et le point de congélation de cette solution est plus faible que celui du solvant pur.

Le point de congélation d'un solvant pur correspond à l'équilibre qui s'établit lorsque la vitesse de solidification est égale à la vitesse de liquéfaction. La présence de solutés dans le solvant diminue la vitesse de solidification alors que la vitesse de liquéfaction reste inchangée. En conséquence, l'addition d'un soluté à un solvant pur provoque un déplacement de l'équilibre solide-liquide vers la phase liquide : seule une diminution de la température peut instaurer un nouvel équilibre, définissant un nouveau point de congélation de solution. Cette diminution est directement proportionnelle au nombre de moles de solutés.

B. Mesure du point de congélation d'une solution : cryométrie

Par définition, le point de congélation d'une solution se définit comme la température à laquelle une quantité infinitésimale de phase solide existe en équilibre avec la phase liquide, à une pression standard.

1. Abaissement cryoscopique

Quand on refroidit un solvant comme de l'eau pure, à condition qu'il n'y ait aucune perturbation extérieure et que le solvant ne soit pas agité, les variations de sa température en fonction du temps se font en quatre étapes (*fig.* 2). L'eau se refroidit et reste sous forme liquide jusqu'à une température inférieure à sa température de congélation (phénomène de surfusion). Par une agitation ou d'autres moyens physiques, les premiers cristaux de glace apparaissent instantanément : cette solidification s'accompagne d'un dégagement de chaleur, amenant rapidement l'échantillon à une température dite de congélation. Celle-ci reste alors constante jusqu'à ce que toute l'eau soit congelée puis, la température de la glace diminue.

Dans le cas d'une solution aqueuse comme les milieux biologiques, la courbe a la même allure (*fig.* 2). La température de congélation est plus basse que pour le solvant pur. De plus, il n'existe pas vraiment un plateau lors de la congélation.

La différence entre la température de congélation du solvant pur et celle de la solution correspond à l'abaissement cryoscopique de la solution, noté $\Delta\theta$:

- Dans le cas d'une solution très diluée, le $\Delta\theta$ est proportionnel à l'osmolalité, O. Selon la loi de Raoult généralisée :

$$\Delta\theta = Kc \cdot O$$

Kc est la constante cryoscopique du solvant. Pour l'eau pure, sa valeur est 1,86, c'est-à-dire qu'une solution molale (1 osmole dans 1 kg d'eau pure) donne un abaissement cryoscopique de 1,86 °C par rapport à l'eau.

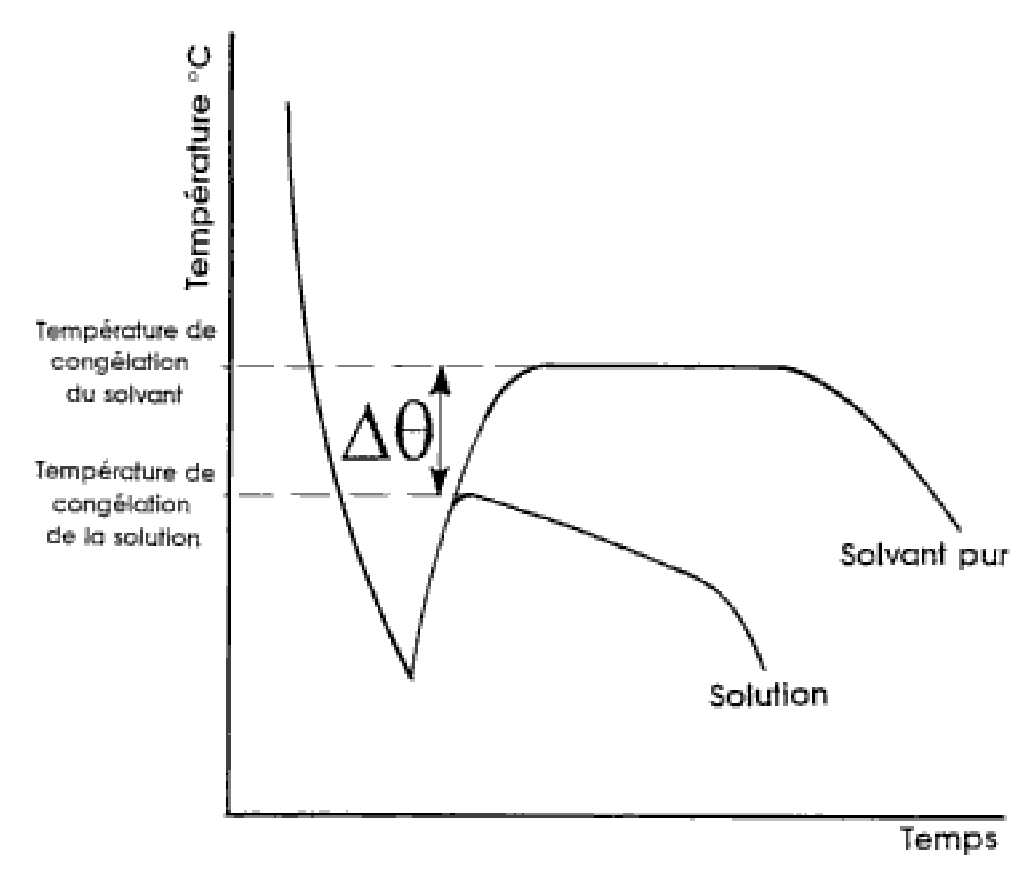


Figure 2. Variations de la température en fonction du temps, au cours du refroidissement d'un liquide

- Dans le cas d'un soluté unique non dissocié de masse molaire M et à la concentration pondérale Cp dans la solution, et si la dilution est suffisante pour confondre osmolarité et osmolalité :

$$\Delta\theta = Kc \cdot (Cp/M)$$

- Dans le cas d'un soluté unique dissocié en solution, l'abaissement cryoscopique peut s'exprimer en fonction du coefficient osmotique g du soluté, du nombre n de particules dues à la dissociation et de sa concentration molaire Cm dans la solution :

$$\Delta\theta = Kc \cdot O = g \cdot n \cdot Cm$$

2. Appareillage

L'abaissement cryoscopique d'une solution est mesurée par des osmomètres cryoscopiques, utilisant le principe précédemment décrit.

L'échantillon placé dans une cellule de mesure est introduit dans une enceinte réfrigérée par effet Peltier. La température est alors abaissée à une valeur définie de surfusion (environ – 7 °C). Puis, par agitation violente ou introduction d'une aiguille froide dans l'échantillon, la phase de congélation commence. Une thermistance plongeant dans la cellule de mesure permet de suivre la température de l'échantillon durant les phases de refroidissement, de surfusion et de solidification. La thermistance incorporée à un pont de Wheatstone détecte le point d'inflexion correspondant au début de la congélation de la solution : la valeur de la température est mémorisée et l'affichage se fait directement en $mosm \cdot kg^{-1}$. Le point zéro du pont Wheatstone est effectué sur l'eau distillée, et d'autres points d'étalonnage sont obtenus avec des solutions standard de NaCl.

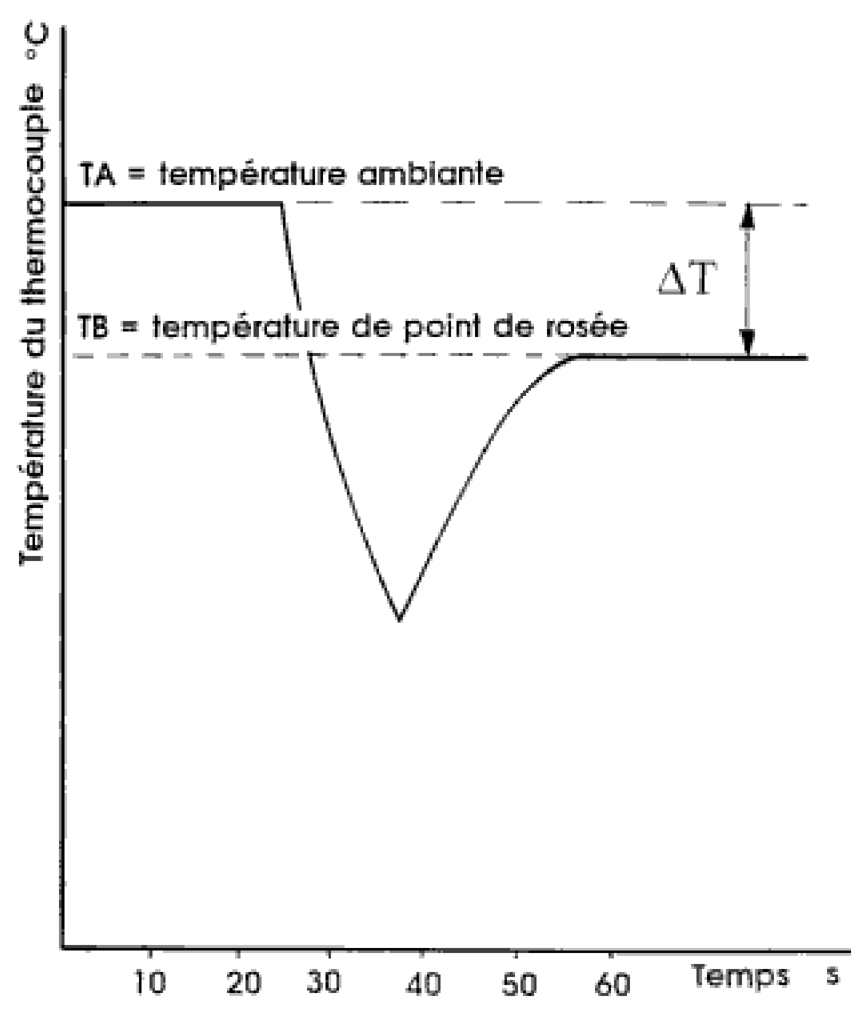


Figure 3. Variations de la température du thermocouple, en fonction du temps

façon asymptotique jusqu'à ce que la condensation s'arrête. Cela entraîne une stabilité thermique, correspondant à la température du point de rosée TB.
La différence entre TA et TB s'exprime comme la diminution ΔT jusqu'au point de rosée et elle est mesurée sous forme de différence de potentiel par le thermocouple. L'appareil est calibré avec des solutions standard, et les résultats sont affichés en unité d'osmolalité ($mosm \cdot kg^{-1}$).
La précision, la fiabilité et l'intervalle de mesure de ces appareils sont comparables aux osmomètres cryoscopiques. Cependant, la manipulation est plus délicate principalement en raison des volumes de prise d'essai de l'ordre de quelques microlitres.

IV. Osmolalité des liquides biologiques

La valeur de l'osmolalité est le reflet du pouvoir osmotique des solutés dissous. Les mouvements de l'eau et des électrolytes en dépendent. L'osmolalité totale est la même dans les trois principaux liquides biologiques : plasma, liquide interstitiel, liquide intracellulaire. Cependant, les proportions respectives d'anions et de cations ne sont pas les mêmes. Dans les trois cas, il y a un plus grand nombre de milliosmoles cationiques que de milliosmoles anioniques, la neutralité électrique étant due à certains anions qui portent un plus grand nombre de charges.


Hidden page

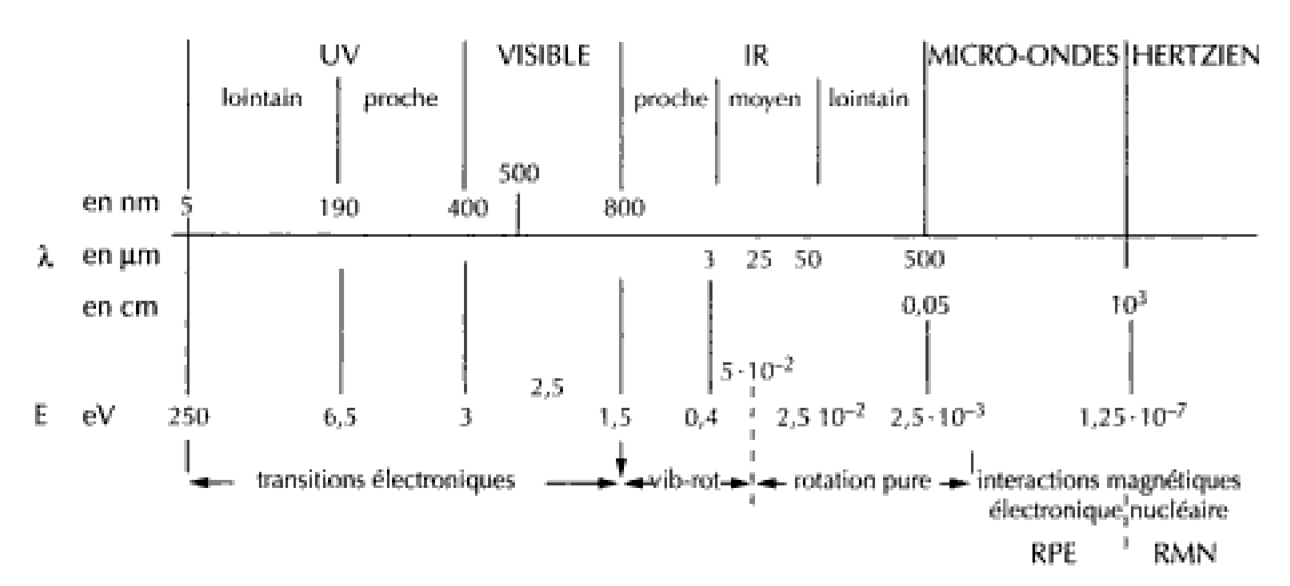


Figure 1. Domaines spectraux

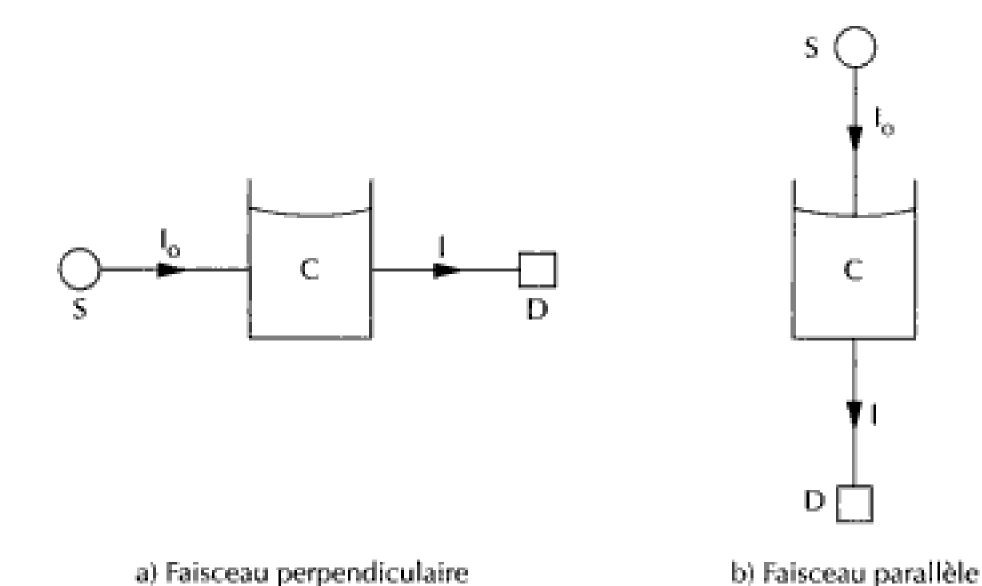
rayonnement avec une substance placée sur le faisceau. Ces variations peuvent concerner des phénomènes d'absorption, de réflexion et de transmission.

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire étudie les variations de transmission de radiations électromagnétiques résultant d'une absorption photonique par des molécules absorbantes.

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire (SAM), UV-visible, fait appel à des photons appartenant au domaine UV-visible, observables avec les appareils habituels, ($\nu = 10^{15} - 10^{14}$ Hz ; λ = 200-400 nm pour UV et 400-800 nm pour le visible).

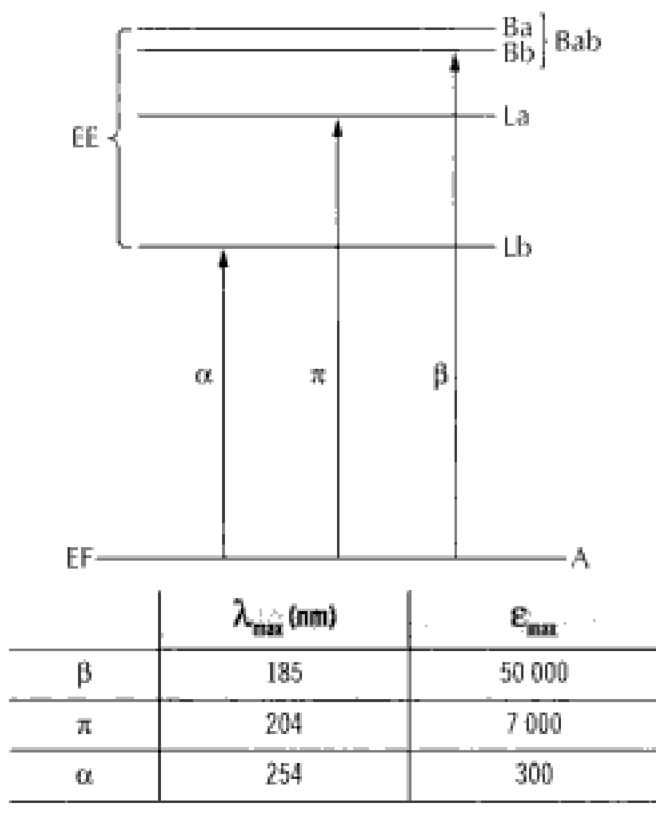
Le terme photométrie signifie que l'on mesure une densité de photons. En SAM, on sélectionne des photons de fréquence ν_0 absorbables par la molécule à étudier. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis (émergent) présente une intensité I inférieure à I_0 (*fig. 2*).

L'absorption de ces photons d'énergie $E = h\nu_0$ par la molécule n'est possible que si cette énergie correspond à une augmentation de l'énergie moléculaire ΔE mise en jeu lors d'une transition permise (quantifiée) de la molécule absorbante. L'énergie,



S = source ; D = détecteur ; C = cuve de mesure.

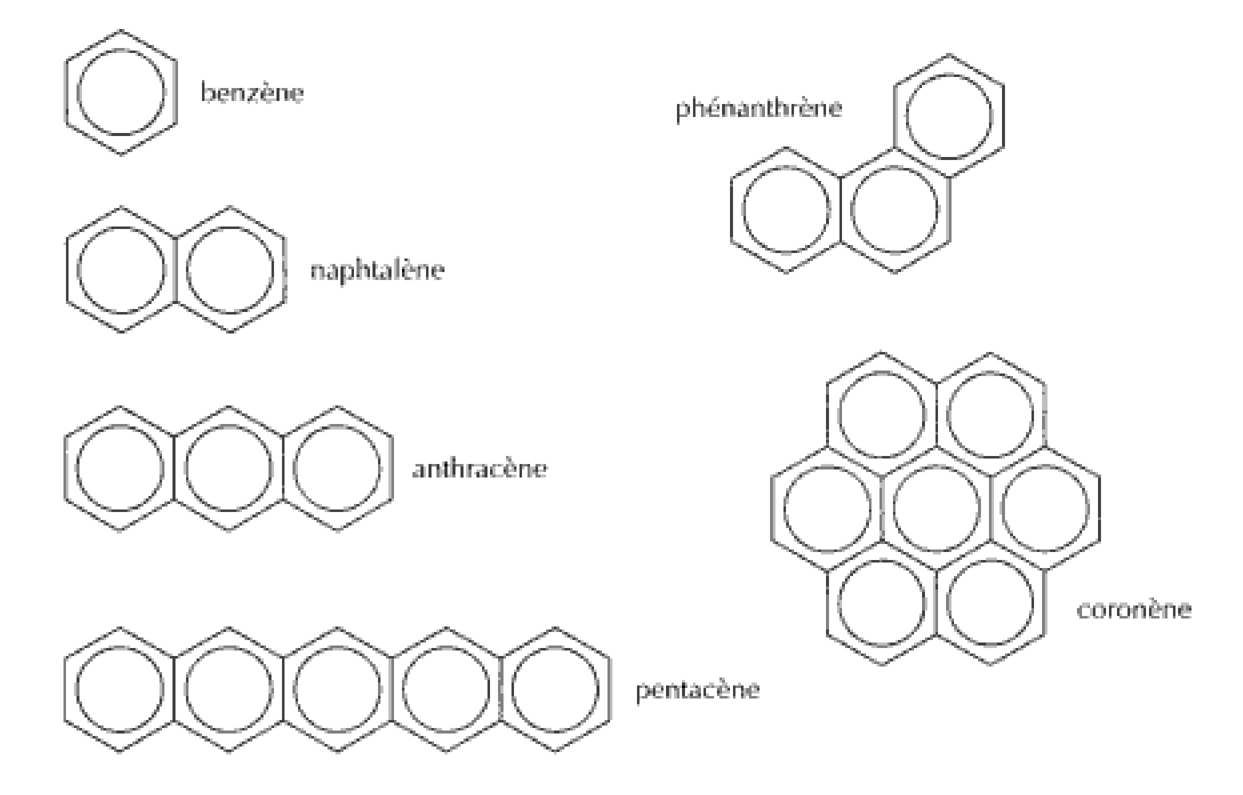
Figure 2. Faisceaux incident (I_0) et émergent ou transmis (I)



	λ_{max} (nm)	ε_{max}
β	185	50 000
π	204	7 000
α	254	300

Figure 4. Niveaux énergétiques du benzène : états multi-électroniques, tenant compte des interactions des électrons (états singulets). Caractéristiques spectrales

Molécules alternantes (benzénoïdes) : molécules qui ne contiennent que des cycles pairs, ce sont des molécules alternantes. Les charges nettes des atomes de carbone sont presque nulles et ces molécules ont un moment dipolaire extrêmement faible. Elles sont très symétriques, les longueurs de liaison sont pratiquement identiques pour tout le cycle (benzène l = 1,39 A, anthracène l = 1,37 à 1,43 A).




Hidden page

En milieu acide, par protonation, il se forme un sel quinoïde rouge.

L'association donneur-accepteur implique :
- une résonance entre formes limites ioniques mésomères ;
- une quasi planéité du système π composite (la structure cis azo non plane diminue la conjugaison).

■ ***Complexes par transfert de charge***

De véritables complexes, résultant d'un transfert de charge entre un donneur à structure π (alcènes, aromatiques) et un accepteur électrophile (acides de Lewis Ag^+, groupe cyano –CN), peuvent conduire à des molécules colorées par absorption photonique.

$$D + A \rightleftharpoons [DA] \xrightarrow{h\nu} [D^+A^-]$$

Tel est le cas des complexes entre le tétracyanoéthylène et un hydrocarbure aromatique donneur, ou des complexes cyclohexène-iode, alcène-Ag^+.

D. Intérêt analytique des spectres d'absorption UV-visible

Comme nous l'avons montré précédemment, le spectre d'absorption UV-visible permet de caractériser une molécule. Il est l'un des critères d'identification de la molécule. Toutefois, l'absorption dans l'UV-visible permet plutôt de caractériser des groupements fonctionnels, dans la mesure où ils sont chromophores, voire auxochromes, et non une molécule dans son ensemble. Si la présence de groupement auxochrome modifie sensiblement l'absorption d'un chromophore, à l'inverse, bien des radicaux ne la modifie pas. En conséquence, la SAM ne permet pas d'identifier de façon absolue une molécule : par exemple les spectres UV-visible de l'acétaldéhyde et du propionaldéhyde sont quasi identiques. D'autres types de spectrométrie seront beaucoup plus adaptés à l'identification des molécules, comme l'IR et la RMN en particulier ou bien encore la spectrométrie de masse (SM).
Si l'on compare les spectres UV-visible d'une solution d'un soluté inconnu à une solution d'étalon pur, dans le même solvant, le spectre UV-visible ne sera qu'un critère parmi d'autres ; il ne sera pas possible de conclure si les deux spectres sont identiques, mais, en revanche, on pourra affirmer la non identité des deux composés si les deux spectres sont différents.
En conclusion, le spectre UV-visible d'une molécule est un critère intéressant en analyse fonctionnelle et, éventuellement, un critère d'identification ne pouvant toutefois être retenu comme critère de pureté.

particules sont diffusés dans toutes les directions et, bien que non absorbés par le soluté en solution, n'appartiennent plus au faisceau I émergent. Le moindre trouble des solutions *fausse de façon très importante* les mesures d'absorbance.
Par ailleurs, les photons constitutifs de I ne doivent pas correspondre à des photons émis par la solution. Les substances fluorescentes, dont les spectres d'absorption et d'émission se chevauchent, ne pourront donc pas être mesurées dans la zone de chevauchement.
Enfin, les solutés qui présentent des directions privilégiées d'absorption (substance dichroïques) ne présentent pas un comportement homogène. Leur analyse quantitative se trouve faussée.

C. Applications à l'analyse quantitative

L'analyse quantitative par spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible repose non seulement sur les conditions énoncées de validité de la loi physique, mais aussi sur la maîtrise du milieu soumis à l'analyse.
Le milieu peut influencer la mesure :
- soit, par modification du signal mesuré : ce phénomène porte le nom d'effet de matrice, on limitera ici ce terme à ce phénomène ;
- soit, par la présence de substances absorbantes parasites, qui, compte tenu de l'additivité de la loi de Beer-Lambert, sont mesurées simultanément.

Il s'agit de deux problèmes différents, (bien que parfois confondus par certains auteurs sous le terme « effet de matrice »). Les solutions analytiques sont différentes.

1. Étalonnages

Pour tout dosage, le procédé d'étalonnage choisi doit essentiellement tenir compte de « l'effet de matrice » potentiel du milieu à doser.

a) Le milieu à doser ne modifie pas le signal mesuré

Dans ce cas, l'étalonnage, le plus simple, peut être réalisé : la solution étalon est obtenue par dissolution du produit pur et sec dans le solvant approprié (eau, éthanol...). Solution étalon et solution à doser sont traitées directement dans les mêmes conditions d'échantillonnage et de volume final.

b) Le milieu modifie le signal mesuré

Deux cas différents peuvent se présenter, auxquels correspondront deux procédés d'étalonnage différents.

■ *Les éléments du milieu modifiant ce signal sont connus*

Leur concentration en est connue et suffisamment constante. On prépare alors des solutions étalons artificielles comportant les dits éléments, aux concentrations attendues.

■ *Le milieu est inconnu*

S'il y a une influence du milieu sur le signal, la relation A = kC devient A = k'C. L'impossibilité de connaître k' impose d'utiliser le milieu à doser comme base de

l'étalonnage. On a recours alors à la **méthode** dite « des ajouts dosés ». Dans ce cas, on introduit un volume constant de la solution à doser dans tous les tubes d'étalonnage puis des quantités croissantes d'un étalon de soluté à doser, de façon telle que le milieu soit homogène et que le volume final soit constant dans tous les tubes. L'absorbance mesurée varie de façon linéaire avec la surcharge ajoutée, selon la *figure 10*. La loi de Beer-Lambert est alors supposée vérifiée. La concentration de l'échantillon à doser peut être déterminée :

- soit en traçant la droite de même pente passant par l'origine ;
- soit à partir de l'intercept de la droite d'étalonnage et de l'abscisse.

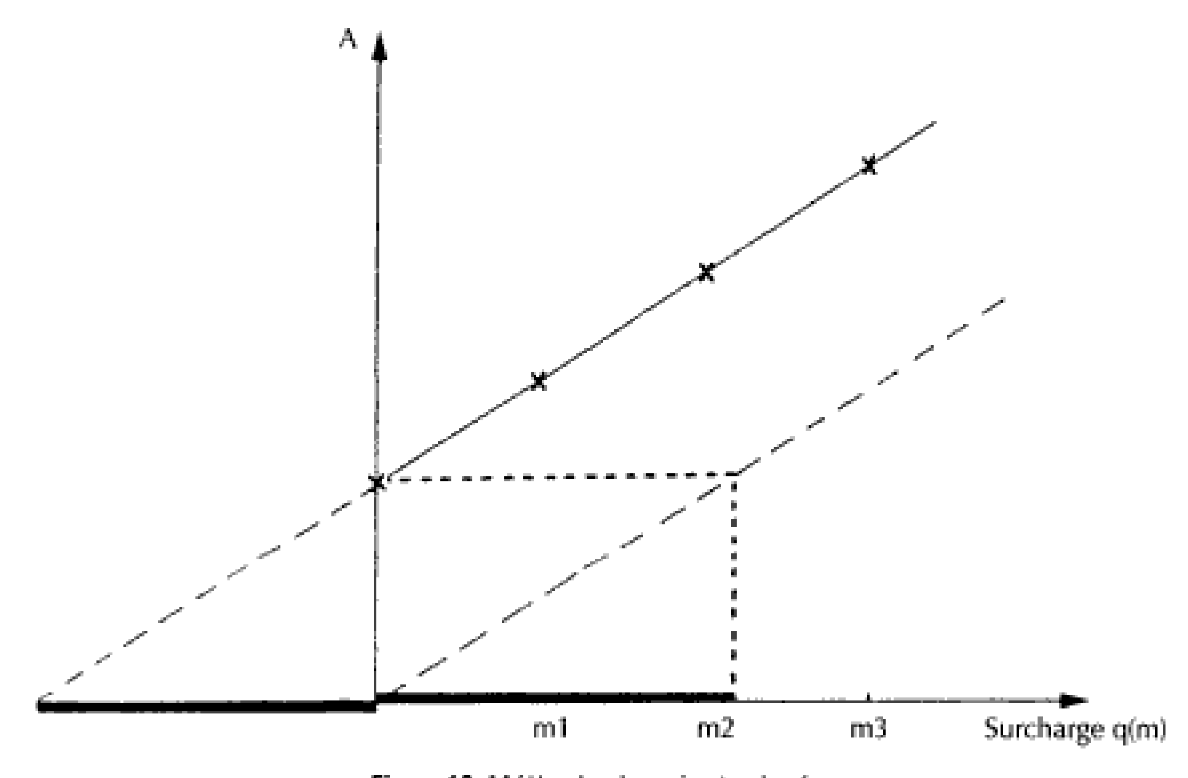


Figure 10. Méthode des ajouts dosés

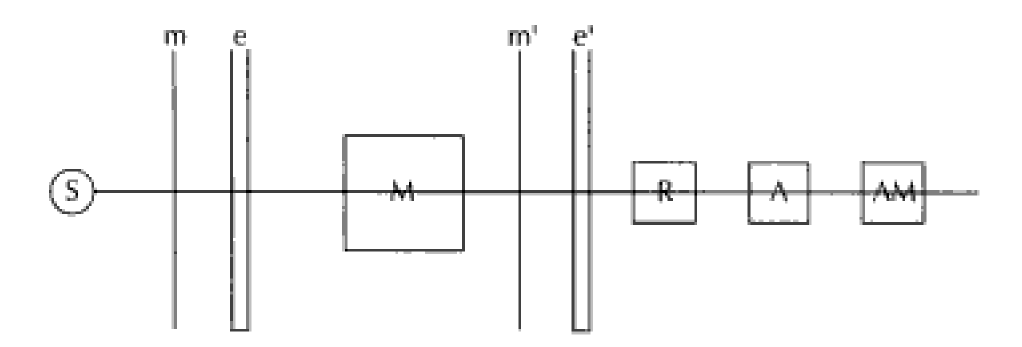
2. Choix de la longueur d'onde

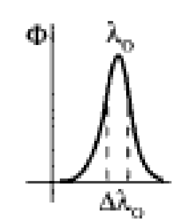
La longueur d'onde choisie pour les mesures quantitatives est théoriquement la longueur d'onde du maximum d'absorption. Ceci pour deux raisons :

- au λ_{max}, l'absorbance mesurée est la plus grande puisque ε y est maximum : la méthode y est la plus sensible ;
- au λ_{max}, le coefficient d'extinction est le plus constant sur un petit domaine $\Delta\lambda$ et, en conséquence, la lumière y est la plus monochromatique (*cf.* précédemment : le milieu modifie le signal mesuré). La linéarité y est optimum.

Cependant, lorsque le milieu à analyser contient d'autres solutés, susceptibles d'absorber à la λ_{max} du soluté à doser, il peut être suffisant de changer de λ de mesure. On choisit alors une λ appartenant au spectre du soluté à doser et n'appartenant pas au spectre des substances interférentes. Dans ce cas, on gagne en spécificité ce que l'on perd en sensibilité et la méthode d'analyse est alors tout à fait acceptable. Toutefois, dans les milieux complexes, il n'est pas toujours aussi simple de s'affranchir des interférences (*cf.* ci-après : Élimination des interférences).

Schéma de principe

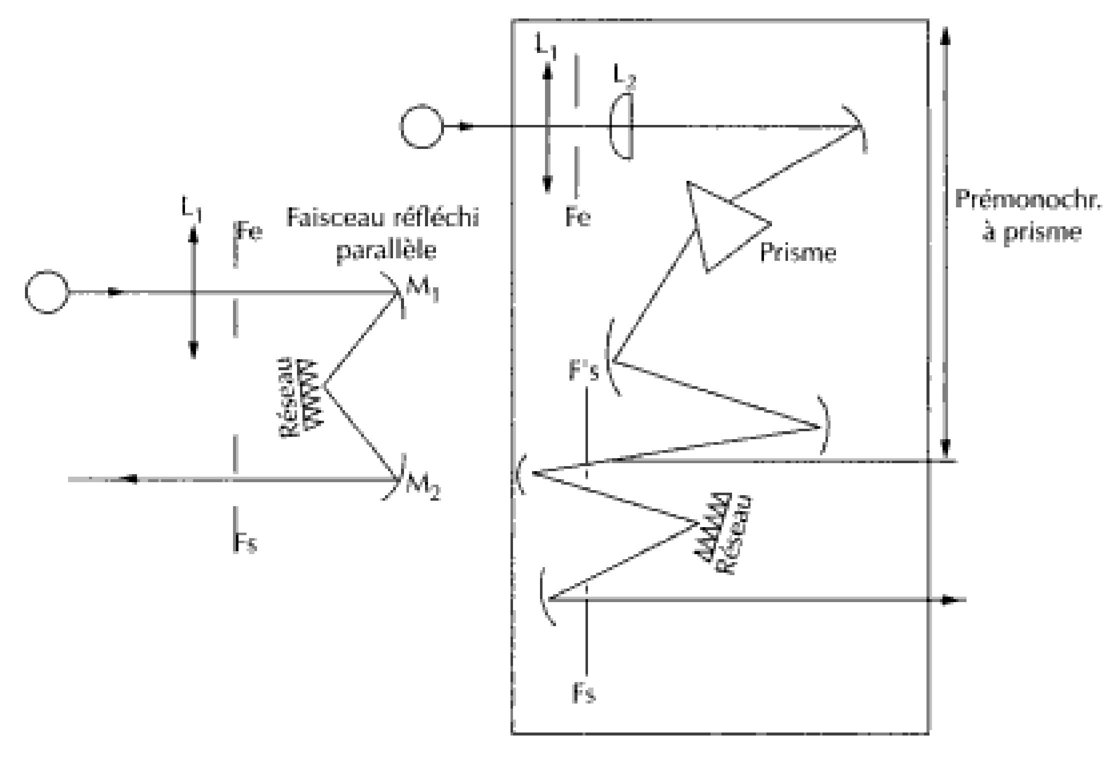




S = source
M = monochromateur
m ou m' = miroir tournant
e ou e' = cuve à échantillon
AM = appareil de mesure
A = amplificateur
R = récepteur

La sélection des radiations sortant du monochromateur s'effectue par rotation du système dispersif (prisme, réseau) ou des lentilles ou miroirs. La qualité d'un monochromateur est définie par sa largeur de bande passante qui est la largeur de bande à mi-hauteur.

Monochromateur simple

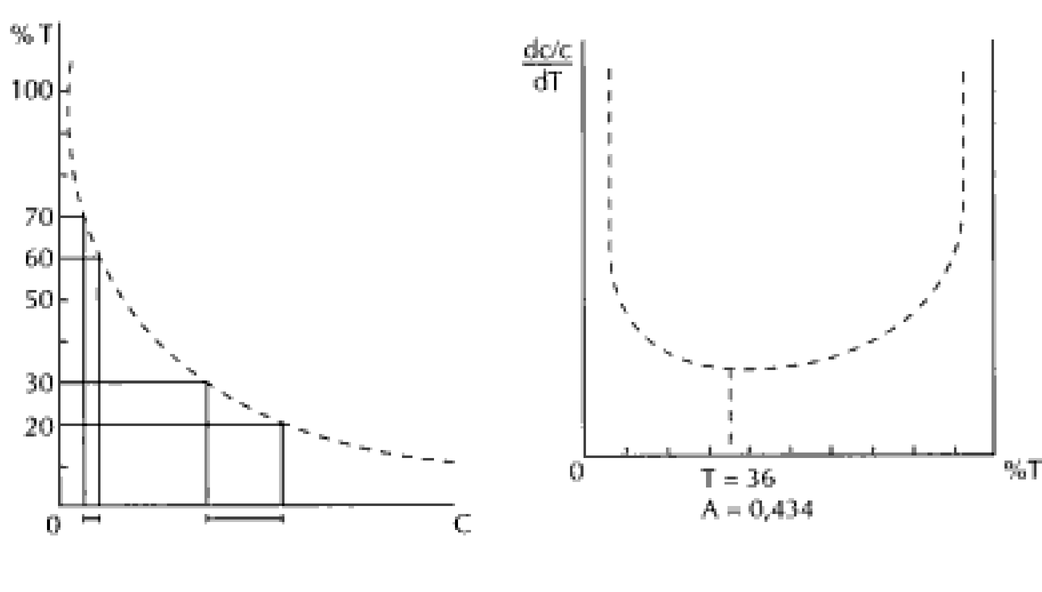


Monochromateur double

L1 = lentille de concentration du flux sur la fente
L2 = lentille donnant un faisceau de radiations parallèles
Fe, Fs = fentes d'entrée, de sortie

Figure 14. Appareillage en spectrophotométrie

fortes, la même erreur absolue sur T conduit à une erreur importante sur la concentration et donc à une erreur relative sur la concentration également élevée. L'erreur relative en concentration dc/c, résultant d'une erreur photométrique dT sur la mesure de T, peut être représentée par la courbe de Ringbom.
Ainsi pour des mesures réalisées, pour un même échantillon (ε fixé), dans une même cuve (l fixé), l'erreur relative en concentration liée à l'incertitude dT sur la mesure de T (erreur photométrique) peut être explicitée par la loi de Beer-Lambert. On montre ainsi que l'erreur relative en concentration est très grande pour les valeurs élevées ou faibles de T, c'est-à-dire aux fortes et faibles concentrations. Elle est minimisée pour des valeurs de T de 20 à 60 %, soit A de 0,7 à 0,22. Elle est minimale pour T = 0,368 soit A = 0,434 (*fig. 17*).



$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = \log\frac{1}{T} = \log\frac{I_0}{I} = -\log T = -\log\frac{I}{I_0} = \varepsilon C_M l = \frac{k}{2{,}303} C_M l = 0{,}434\, kC_M l$$

$$\ln T = kC_M l$$

$$\frac{dT}{T} = -kdcl \qquad dc = -\frac{dT}{T}\frac{1}{kl}$$

K, l = constantes

dc/c = erreur relative en concentrations, fonction de l'erreur photométrique dT sur T

$$\frac{dc}{c} = -\frac{dT}{T}\frac{1}{klc}$$

$$\frac{\frac{dc}{c}}{dT} = -\frac{1}{T}\frac{1}{lkc} = -\frac{1}{T}\frac{1}{2{,}303 \log T^{-1}} = -\frac{0{,}434}{T \log T^{-1}} = -\frac{0{,}434}{T \cdot A} = -\frac{0{,}434}{T \cdot \log\frac{I_0}{I}}$$

minimum pour A = 0,434
T = 0,36

Figure 17. Courbe de Ringbom – Erreur relative en concentration en fonction de l'erreur absolue en transmission

6. Contrôle des spectrophotomètres

Les mesures spectrophotométriques peuvent être entachées d'erreur soit :
- à cause de l'appareil lui-même qui peut être mal conçu, mal réalisé ou mal réglé ;

- à cause d'une mauvaise utilisation de l'appareil dans des conditions ne répondant pas aux prescriptions du constructeur ou aux lois théoriques de la spectrophométrie ;
- ou bien encore, à cause de l'échantillon et de son contenant (solution, cuve...)

Ainsi, les spectrophotométres doivent être testés non seulement lors de leur mise en route, mais également régulièrement pendant les années d'utilisation.
Un certain nombre de contrôles élémentaires sont à la disposition des utilisateurs :
- contrôle des longueurs d'ondes :
  - exactitude des longueurs d'ondes,
  - reproductibilité ;
- contrôle des absorbances :
  - exactitude,
  - reproductibilité,
  - linéarité ;
- enfin, contrôle de lumière parasite.

a) Contrôle des longueurs d'ondes

■ *Exactitude des longueurs d'ondes*

Pour contrôler l'exactitude des longueurs d'ondes, généralement, on enregistre les spectres d'absorption de composés présentant des bandes étroites tels que les sels ou les oxydes de terres rares.
Les métaux les plus utilisés sont :
- l'holmium (Z = 67) surtout ;
- le néodyme et le praséodyme, seuls ou en mélange.

Ces métaux sont utilisés :
- en solution sous forme de sels NO_3, ClO_4... ;
  - solution du commerce HOLNICOB (Biotrol – nitrate Holmium à 50 $g.L^{-1}$),
  - la Pharmacopée française préconisant l'utilisation du perchlorate d'holmium (R), soit une solution à 4 % (m/v) d'oxyde d'holmium dans $HClO_4$ N (2) ;
- sous forme de verres aux oxydes de terres rares :
  - holmium,
  - didynium (mélange néodyme + praséodyme).

Les valeurs exactes des maximums caractéristiques sont répertoriées à la Pharmacopée pour la solution R (2) et sont précisées par les fournisseurs pour les autres réactifs.
Remarque :
- facile d'emploi pour des appareils doubles faisceaux, plus délicat pour des mono faisceaux ;
- si l'appareil dispose d'une lampe à vapeur de mercure, il sera possible d'utiliser pour contrôler les longueurs d'ondes : 313 – 365 – 405 – 435,8 – 546,1 nm. Ce procédé est très bien adapté au mono faisceau.

■ *Reproductibilité des longueurs d'ondes*

Les mesures précédemment décrites sont répétées plusieurs fois, afin de calculer m et s, pour déterminer le coefficient de variation (CV). s doit être < à 0,5 nm.

b) Contrôle des absorbances

Pour contrôler les mesures d'absorbances, on choisit des composés ayant cette fois de larges bandes d'absorption afin d'éviter les erreurs de λ_{max}.

- Exactitude
  - filtres : NBS (*National Bureau of Standards*) ;
  - substance du référence en solution :
    - sels de Nickel ou de Cobalt (NI COB),
    - $(NO_3)_2$ Ni : 0,1 à 0,4 M,
    - $(NO_3)_2$ Co : 0,025 à 0,2 M ;
- Reproductibilité des absorbances :
  - mesure du CV ;
- Linéarité de la réponse.

c) Contrôle de la lumière parasite

On utilise :
- des solutions absorbantes donnant une transmission T nulle (KCl, NaBr, acétone l = 1 cm) ;
- ou des verres spéciaux du commerce T < 0,1 %.

B. Détecteurs de chromatographie liquide en SAM UV-visible

Il n'existe pas aujourd'hui de détecteur de chromatographie liquide (LC) dont les performances sont équivalentes à celles des détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse (GC). En effet, les détecteurs LC ont des sensibilités d'environ trois ordres de grandeur inférieures à celles présentées par les détecteurs GC. De même, leur domaine de linéarité dynamique est également plus restreint que celui observé pour les détecteurs GC. Ainsi, seuls quelques détecteurs LC hautement spécifiques peuvent rivaliser en sensibilité avec les détecteurs GC. De façon globale, les spécifications des détecteurs LC sont les mêmes que celles des détecteurs GC, exception faite de la dispersion. En effet, la dispersion a de faibles conséquences au plan de la résolution en GC, tandis qu'elle peut totalement ruiner le pouvoir d'une colonne LC si le système n'est pas correctement conçu dans sa globalité. En particulier, quel que soit le type de détecteur considéré en LC, celui-ci pourra contribuer, de façon non négligeable, à la dispersion de la bande échantillon à plus d'un titre et notamment de par la valeur finie de la cuve de mesure ainsi que par sa constante de temps.

Ainsi, la valeur finie de la cuve de mesure, où circule en continu l'éluat chromatographique, contribuera à la variance du pic chromatographique au travers de deux processus, à savoir : d'une part, la dispersion due à l'écoulement newtonien d'un fluide, d'autre part, l'élargissement de la bande échantillon résultant directement de la valeur finie de la cuve de mesure.

1. Dispersion résultant de l'écoulement newtonien d'un fluide

La plupart des cuves de mesure utilisées sont de forme cylindrique et présentent une longueur relativement courte ainsi qu'un rapport longueur/diamètre relativement faible. Dans de telles conditions, l'approche théorique de Golay sur la dispersion de la bande échantillon dans un tube ouvert, pour une vitesse linéaire du fluide relativement importante :

$$\sigma_v = \left(\frac{\pi l Q}{24 D_m}\right) r^2$$

En effet, ce type de lampe émet pratiquement toute son énergie lumineuse à 254 nm. D'autres types de lampes peuvent également être utilisées pour opérer à des longueurs d'onde différentes de 254 nm. Ainsi la lampe à vapeur de cadmium basse pression génère la quasi-totalité de sa lumière à 229 nm, tandis que la lampe à vapeur de zinc basse pression émet quant à elle principalement à 214 nm. Comme mentionné précédemment aucune lampe n'est strictement monochromatique et par suite elles présentent toutes d'autres raies d'émission présentant des intensités relativement faibles :
- 313 nm pour lampe à Hg basse pression ;
- 326 nm (pratiquement aussi intense que celle à 214 nm) et à 280 nm pour la lampe à Zn basse pression ;
- ou bien encore 326, 347, 340 et 325 nm (toutes relativement intenses) pour la lampe à Cd basse pression.

Par suite, pour obtenir des radiations monochromatiques, le recours à des filtres est absolument nécessaire. Le coût de tels filtres interférentiels étant important, on comprend la raison pour laquelle la lampe à Hg basse pression est la plus populaire pour ce type de détecteur UV. Toutefois, malgré le coût élevé des filtres interférentiels, les lampes à Cd et Zn, émettant à des longueurs d'onde qui peuvent conduire à une augmentation significative de la sensibilité de la réponse pour des substances telles que les protéines et les peptides, présentent de toute évidence un intérêt dans les domaines en relations avec la biotechnologie. Pour les raisons déjà discutées, les cuves de mesure de ce type de détecteurs UV ont une géométrie en « Z » afin de réduire la dispersion de la bande échantillon au moment de la détection. Les détecteurs UV sont sensibles aux changements de débit et de pression, mais toutefois cette instabilité peut être notamment réduite si le détecteur UV est bien thermostaté. Les détecteurs UV à longueur d'onde fixe sont parmi les détecteurs les plus couramment utilisés en raison de leur coût d'investissement, qui est modeste, de leur sensibilité ($0{,}5.10^{-7}$ $g.mL^{-1}$) et de leur domaine de linéarité dynamique (environ trois ordres de grandeur).

5. Détecteur UV multi-longueurs d'onde

Les détecteurs UV multi-longueurs d'onde utilisent des sources qui émettent sur une large gamme de longueurs d'onde. Grâce au recours à un dispositif optique approprié (prisme ou réseau), une radiation électromagnétique de longueur d'onde précise peut être sélectionnée à des fins de détection d'une substance ou d'un ensemble de substances, dont le maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde choisie, portant ainsi la sensibilité de leur détection à son maximum. Alternativement, pour les détecteurs dispersifs classiques, le spectre d'absorption des substances éluées peut être obtenu à des fins d'identification, sous réserve d'immobiliser le pic chromatographique dans la cellule en arrêtant le débit (technique du « stop flow »), afin de scanner sur le domaine entier de longueurs d'onde. Une telle prise de spectres peut ne pas nécessiter l'arrêt du débit de la phase mobile si le détecteur multi-longueurs d'onde utilisé est de type « barrette de diodes » (*cf.* ci-dessous : Les barrettes de diodes, photodiode ARRAY–PDA). En effet, il existe deux types de détecteurs multi-longueurs d'onde : les détecteurs dispersifs et les détecteurs à barrette de diodes, ces derniers étant aujourd'hui extrêmement répandus. En fait, s'il y a, aujourd'hui, très peu de détecteurs dispersifs disponibles commercialement, il en existe encore de très nombreux utilisés dans les laboratoires d'analyse. En réalité, comme mentionné précédemment quel que soit le type de détecteurs multi-longueurs d'onde considéré, ils

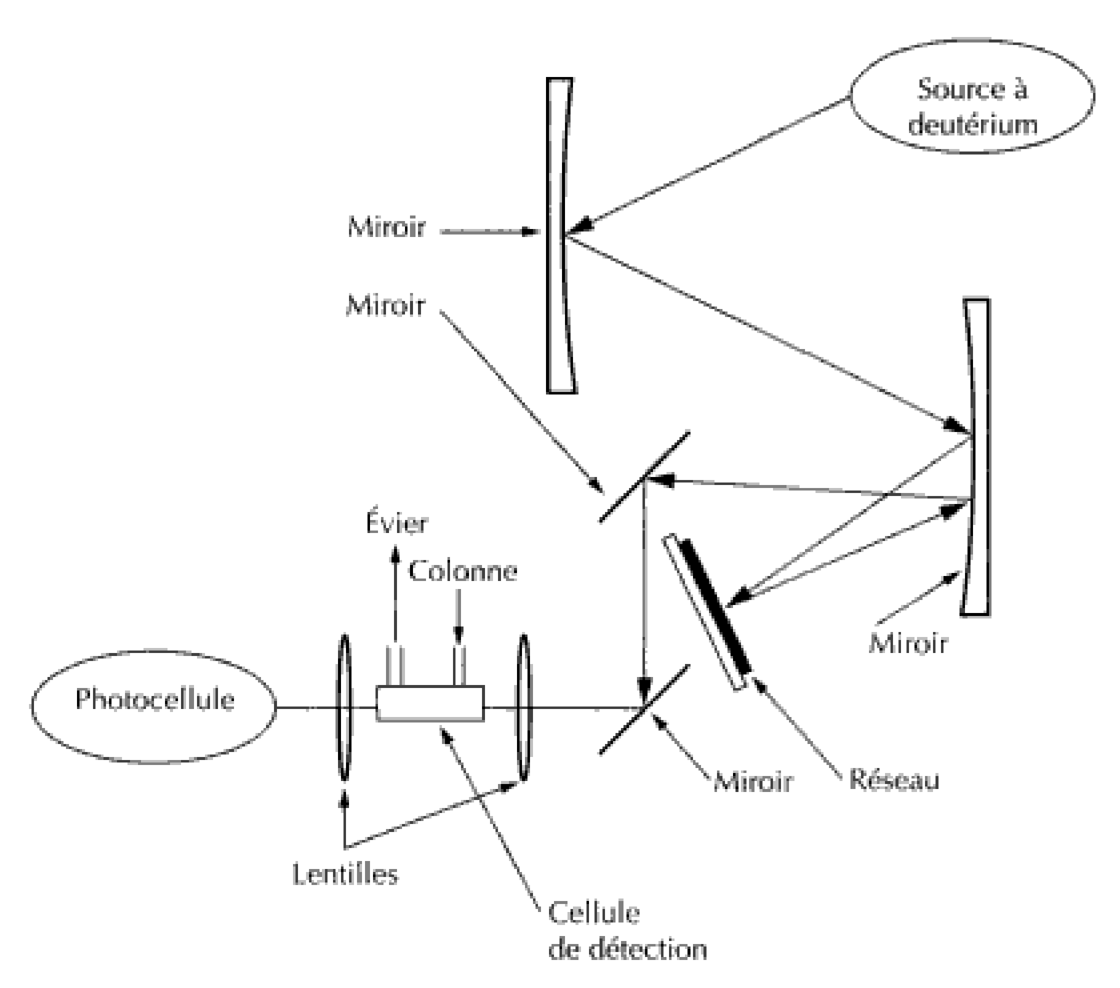


Figure 19. Schéma de principe d'un détecteur de type dispersif

seconde lentille sur la photocellule qui fournit une réponse qui est fonction de l'intensité transmise. Comme déjà mentionné, ce type de détecteur possède, en général, une fonctionnalité qui permet de balayer l'ensemble du domaine spectral de la source, afin d'enregistrer le spectre correspondant à l'éluat chromatographique emprisonné dans la cellule, lors d'un « stop flow » au niveau du chromatographe. Une telle approche peut s'avérer intéressante pour une éventuelle identification des molécules chromatographiées.

En général, le recours à un détecteur multi-longueurs d'onde est réalisé dans le but d'accroître la sensibilité de détection en choisissant une longueur d'onde caractéristique de la substance étudiée. L'emploi d'un tel système peut également, dans certains cas, permettre d'obtenir une augmentation de la sélectivité de détection. Dans ce cas, on choisit une longueur d'onde telle que les molécules présentes dans le milieu analysé et qui n'ont que peu d'intérêt pour l'analyste n'absorbent pas ou absorbent peu.

b) Spectrophotomètre à réseau oscillant

Il s'agit également d'un détecteur UV à balayage : la sélection des λ est assurée par un réseau oscillant piloté par un scanner à faible inertie ou LIS (*Low Inertial Scanning*). Ce LIS permet de déplacer et de positionner le réseau de façon rapide, précise et fiable (utilisation de forces électromagnétiques). Une simple photodiode reçoit les rayons lumineux de différentes λ, après traversée de la cellule contenant l'échantillon (ex. : Focus de TSP).

Ainsi, il est possible :

- de faire des mesures cinétiques de réactions rapides ;
- de réaliser des spectres de solutions dont la composition change dans le temps : comme les effluents de chromatographie liquide ;
- de tracer *a posteriori* un chromatogramme à une longueur d'onde quelconque sur la gamme explorée.

De plus, les détecteurs de type barrette de diodes peuvent être utilisés d'une façon totalement unique et performante en ce qui concerne l'évaluation de la pureté d'un pic. En effet, quand on utilise un détecteur à barrette de diodes, il devient possible d'effectuer le rapport des densités optiques pour deux longueurs d'onde différentes à travers l'ensemble du pic chromatographique considéré. Si ce rapport demeure à une valeur constante il y a de grandes chances que le pic correspond à un produit unique. En revanche, si ce rapport des absorbances à deux longueurs d'onde n'apparaît pas constant à travers le pic chromatographique alors on est certain que le pic chromatographique renferme plus d'un produit et donc que la séparation n'est pas satisfaisante. En réalité, comme on peut réaliser de tels rapports pour l'ensemble des longueurs d'onde émises par la source, la validité de critère de la pureté du pic peut tendre vers la certitude. Cette approche peut même être complétée par la prise de spectres au cours de l'élution du pic chromatographique : par exemple en pied de pic sur le front montant, à mi-hauteur du front montant, au sommet du pic, à mi-hauteur sur le front descendant, enfin sur la traînée, et en comparant les spectres enregistrés. Enfin au plan de l'évaluation de la qualité d'une séparation, il existe des logiciels développés par les constructeurs de détecteurs à barrette de diodes qui évaluent, sur des bases de traitements statistiques, le nombre de composés éluant sous un pic.

■ ***Résolution spectrale***

Comme établi ci-dessus, plus large est le domaine de λ, plus basse est la résolution spectrale. Par exemple : si on dispose de 50 diodes pour explorer un domaine de 250 nm, une mesure sera faite toutes les 5 nm.

Les performances actuelles des PDA reposent sur une nouvelle technologie le « lightpipe » permettant d'augmenter la sensibilité des PDA classiques. La cellule « lightpipe » possède un revêtement interne réfléchissant totalement la lumière à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi de conduire la lumière par réflexion totale. L'augmentation du signal est due :

- à l'augmentation du trajet optique de la cellule : 50 mm au lieu de 10 (ce qui multiplie le signal par cinq) ;
- et à l'augmentation du rendement lumineux (qui diminue le bruit de fond), le rapport signal/BF augmente.

Enfin la mise en forme du faisceau par fibre optique assure aussi une meilleure sensibilité.

Conclusion

En guise de conclusion nous pouvons dire que les différents types de détecteurs UV multi-longueurs d'onde sont très similaires en termes de sensibilité qui se situe aux environs de 10^{-7} g.L^{-1}, avec un domaine de linéarité dynamique d'environ 5 000.

Ainsi les détecteurs UV multilongueurs d'onde s'avèrent moins sensibles que les détecteurs UV à longueurs d'onde fixe. Un tel constat explique donc l'intérêt encore porté aux détecteurs à longueurs d'onde fixe.

L'essentiel de la question

En résumé, la spectrophotométrie d'absorption UV-visible est un outil précieux au chimiste analyste pour les deux domaines complémentaires de toute analyse : l'identification puis le dosage.

Sur le plan quantitatif, la loi de Beer-Lambert peut être qualifiée de fondamentale, de nombreuses méthodes d'analyse développées aujourd'hui étant fondées sur son application. Bien que simple dans son énoncé, sa mise en œuvre nécessite une très bonne connaissance des conditions d'applications. Quelques précautions s'imposent tant au niveau de la conception ou de l'utilisation des spectrophotomètres que dans le soin à apporter aux échantillons à doser. Sur le plan qualitatif, la spectrophotométrie d'absorption UV-visible apporte indéniablement de précieuses indications au plan structural (présence ou non de chromophore et identification du groupement fonctionnel correspondant, système conjugué ou non et importance de cette conjugaison), toutefois le faible pouvoir résolutif des spectres UV-visible en solution ne permet généralement pas une identification stricte d'une structure moléculaire précise.

Enfin en tant que système de détection en chromatographie liquide, la spectrophotométrie d'absorption UV-visible apparaît comme incontournable par suite de sa relativement grande sensibilité, d'une spécificité acceptable, associées à une linéarité dynamique intéressante et ce pour un coût relativement modique lorsque l'on fait appel à des spectromètres à filtres interférentiels. Bien que de coût nettement plus élevé les détecteurs UV-visibles à barrette de diodes présentent de nombreux avantages en autorisant l'enregistrement des spectres sur le domaine entier, choisi, de longueurs d'onde et pendant la totalité de l'analyse chromatographique. Les progrès de la micro-informatique permettant leur stockage en ligne puis le retraitement *a posteriori* des informations ont permis d'élaborer des approches précieuses aux analystes en terme d'identification : par comparaison des spectres pris en vol avec ceux de la bibliothèque incluse dans l'informatique, voire par la détermination des critères de pureté de pics chromatographiques grâce aux nombreux ratios des absorbances à différentes longueurs d'onde. Enfin cette approche au plan de la détection en association avec des traitements statistiques et chimiométriques peut aboutir à la déconvolution de pics, ou pour le moins accéder à la connaissance de nombre de produits co-élués sous un pic, la spectrophotométrie d'absorption UV-visible apportant alors la résolution là où les conditions retenues pour l'analyse chromatographique ne se révèlent pas totalement satisfaisantes.

Pour en savoir plus

- Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. Pharmacopée française X[e] édition juillet 1986 V6.19.
- Scott R.P.W. Liquid Chromatography Detectors, Chromatography Editions Series. Editor J. Wiley

Les molécules les plus fluorescentes sont :
- les polycycles aromatiques (naphtalène, anthracène…) et certains hétérocycles (quinoléines, coumarines, indoles…). Plus la molécule est rigide, plus la fluorescence est importante. L'effet des substituants est important :
  - sont activateurs de fluorescence les substituants ortho- ou para-directeurs (–NR > –NH > –OR > –OH),
  - sont désactivateurs les substituants méta-directeurs (–COOH, –COOR, –CHO, –COR, $-NO_2$, –NO) et les atomes lourds ;
- les groupements alkyl et acide sulfonique n'ont pas d'effet.

Lorsque toutes ces conditions sont remplies, la fluorescence d'une molécule est observable à condition d'être dans un solvant approprié et que le milieu ne renferme pas de « quencheur », constituant capable d'« éteindre » la fluorescence.

IV. Appareillage

Un spectrofluorimètre est constitué des éléments suivants (*fig. 3*) :
- une source lumineuse ;
- un monochromateur d'excitation ;
- un compartiment échantillon (cuve) ;
- un monochromateur d'émission ;
- un photomultiplicateur ;
- un système de lecture du signal.

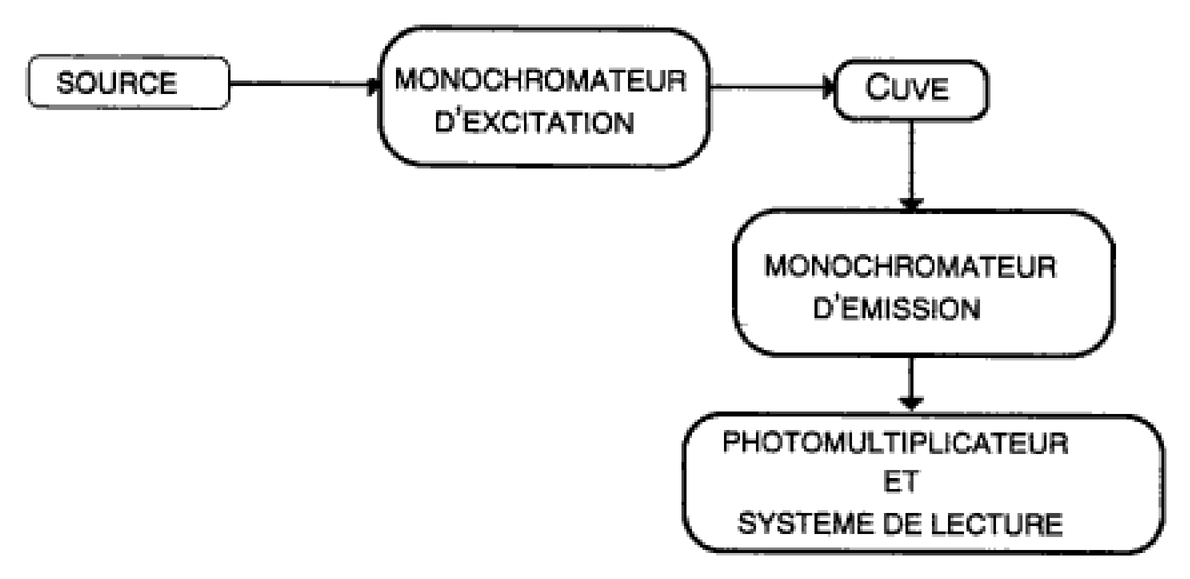


Figure 3. Schéma d'un spectrofluorimètre à simple faisceau

A. Source lumineuse

Parmi les sources les plus utilisées, on distingue les lampes au xénon et les lampes à arc au mercure.
- Les lampes aux xénon émettent en continu entre 220 nm et 700 nm. Leur énergie varie en fonction de la longueur d'onde. Ce sont les plus performantes.

B. Phénomènes liés aux mesures en solution

Lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont proches, il ne faut pas confondre la fluorescence de l'échantillon avec les diffusions Rayleigh et Raman.
En effet, dans les solutions faiblement concentrées, la lumière est fortement diffusée par le solvant et peut présenter, en partie, la même longueur d'onde que le faisceau d'excitation (diffusion Rayleigh) et, pour une autre partie, une longueur d'onde différente (diffusion Raman).

C. Phénomènes liés à l'échantillon

La fluorescence peut être modifiée en raison de phénomènes provenant de la molécule elle-même (phénomènes internes) ou d'une interaction avec les molécules du solvant (phénomènes externes).

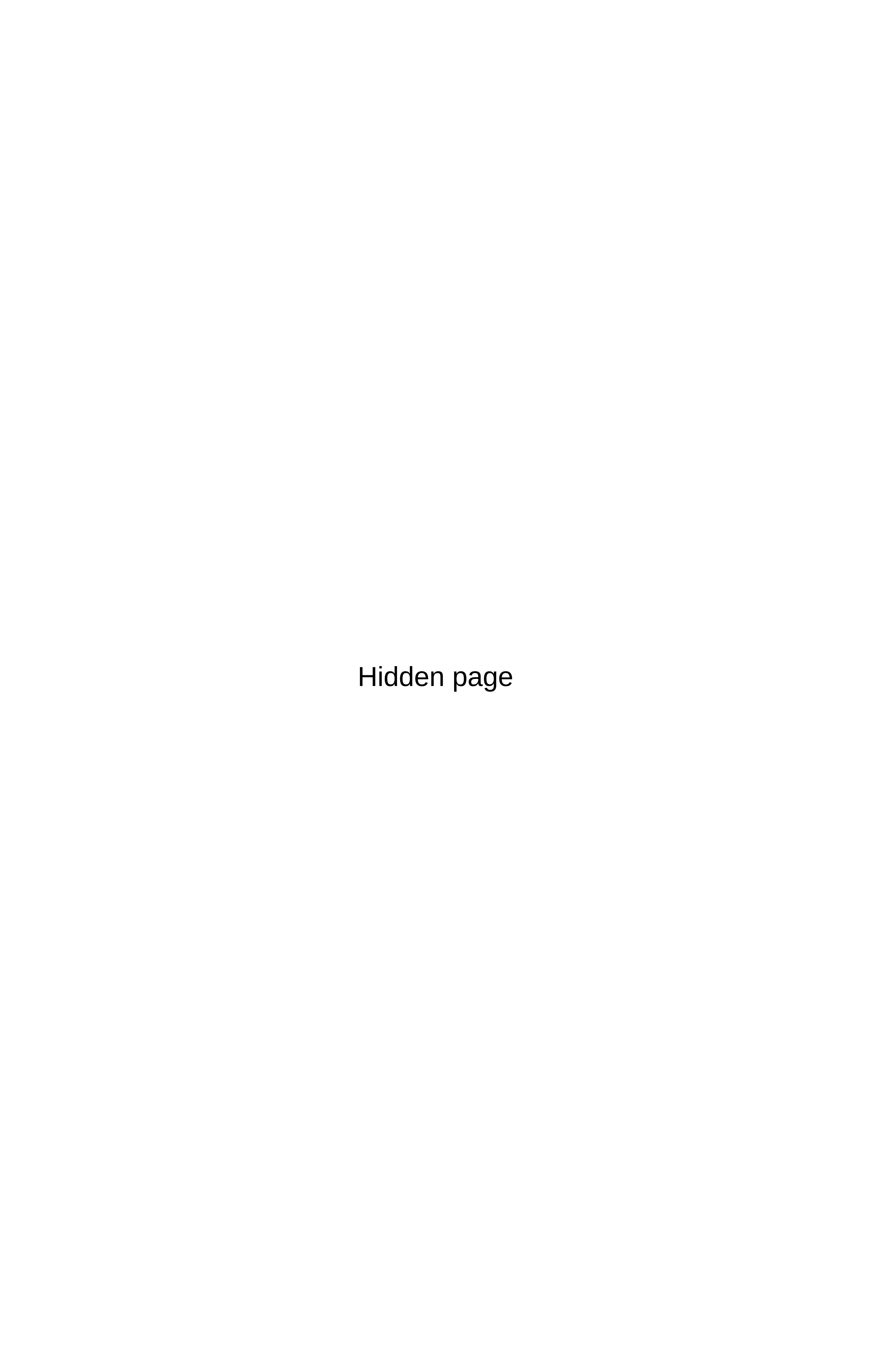
1. Phénomènes internes

Une photo décomposition apparaît lorsque la transition est très énergétique et le faisceau d'excitation très intense. Elle est mise en évidence en effectuant plusieurs mesures successives sur une même solution.
Un effet de filtre interne se traduit par une décroissance de la fluorescence alors que la concentration du fluorophore augmente. Il se produit lorsque l'absorbance de la solution est supérieure à 0,02. Il provient d'une part d'une absorption importante du faisceau incident et, d'autre part, d'une réabsorption d'une partie de la lumière émise. Concrètement, dans une solution diluée de molécules fluorescentes, la fluorescence est constante en tout point de la solution. À l'inverse, lorsque la concentration est élevée, seules les molécules à l'extérieur de la solution sont fluorescentes.
Le temps d'exposition, ainsi que l'augmentation de la température, peuvent réduire l'intensité de la fluorescence.

2. Phénomènes externes

Parmi les phénomènes externes, la nature du solvant, le pH, le « quenching », sont susceptibles de modifier la fluorescence :

- nature du solvant : la polarité, le pouvoir donneur ou accepteur de liaisons hydrogène, la viscosité peuvent modifier la fluorescence ;
- pH : les modifications de structure liées à la dissociation d'un acide faible ou d'une base faible en solution peuvent conduire à une modification de l'absorbance et donc de la fluorescence ;
- le « quenching » désigne l'inhibition de la fluorescence due à la présence d'autres molécules que celles du fluorophore dans le milieu. Cette inhibition peut se produire sous l'influence d'une collision entre le fluorophore et le « quencher », ou par transfert d'électrons, sans collision. Les atomes lourds et en particulier les halogénures sont très souvent inhibiteurs de fluorescence. L'oxygène moléculaire dissout est également un « quencher » usuel, surtout en milieu polaire. Les métaux de transition paramagnétiques ainsi que les solutés possédant un caractère accepteur d'électron sont souvent inhibiteurs. En milieu tamponné, les composés phosphatés sont des inhibiteurs de fluorescence.


Hidden page

II. Aspects théoriques

A. Atome et théorie quantique

Les phénomènes d'absorption et d'émission atomiques correspondent à des transferts d'énergie qui ne peuvent, selon la théorie quantique, se produire que par valeurs discontinues ou quanta d'énergie $E = h\nu$ (h = constante de Planck et ν = fréquence du rayonnement).
Ces variations de niveaux d'énergie de l'atome s'expliquent très bien dans le modèle atomique de Bohr. Selon ce modèle, les électrons circulent autour du noyau sur des orbitales caractérisées par leur niveau d'énergie. Les orbitales les plus proches du noyau correspondent aux énergies les plus basses, donc les plus stables. Les électrons vont remplir ces différentes orbitales à partir des plus internes vers les plus externes en suivant le principe d'exclusion de Pauli. Selon celui-ci, deux électrons présentant exactement la même configuration quantique ne peuvent occuper la même place.
En effet, chaque électron peut être caractérisé par 4 nombres quantiques qui sont :
n : nombre quantique principal représentant la couche électronique ($n \geq 1$)
l : nombre quantique azimutal, lié au moment cinétique orbital et définissant la sous-couche ($l \leq n - 1$)
m : nombre quantique magnétique définissant la case quantique ($-l \leq m \leq +l$)
s : spin de l'électron ($s = \pm 1/2$)
Ainsi, un atome présente différentes couches électroniques, nommées K, L, M, N, O, P, Q (de la plus proche du noyau à la plus externe), chacune pouvant accueillir un nombre différent d'électrons (respectivement 2, 8, 18, 32…). Pour les éléments les plus simples, un électron ne peut occuper une couche que si toutes les couches inférieures sont remplies, réalisant ainsi la configuration de moindre énergie et de plus grande stabilité. Chaque couche se subdivise en sous-couches (s, p, d, f…) caractérisées elles aussi par leur niveau d'énergie.
Notons qu'en l'absence de champ magnétique, toutes les cases quantiques (définies par le nombre quantique magnétique m) ont la même énergie. En revanche, en présence d'un champ magnétique, il apparaît de nouveaux niveaux d'énergie. Ce phénomène, l'effet Zeeman, est mis à profit en absorption atomique pour la correction des absorptions non spécifiques et sera détaillé plus loin.
L'énergie de chaque niveau peut être calculée par la différence avec l'énergie du niveau le plus bas, le niveau fondamental, et exprimée en électrons-volts (eV). La différence d'énergie entre deux niveaux quelconques peut être calculée de la même façon.
Toutes les transitions électroniques ne sont pas possibles ; en effet, il existe des règles quantiques de sélection qui en limitent le nombre. Elles ne seront pas détaillées ici.

B. Excitation

Lorsqu'un atome à l'état fondamental reçoit un apport d'énergie, l'électron périphérique peut passer sur une orbitale qui sera d'autant plus externe que l'énergie absorbée sera grande. L'énergie peut être apportée sous différentes formes, chaleur, choc, lumière…, ce dernier cas correspondant au phénomène d'absorption atomique mis à profit en spectrométrie.

L'ionisation diminue donc avec la concentration en électrons mais augmente quand l'énergie d'ionisation diminue, ou quand la température augmente.
Lorsque l'on dose des éléments facilement ionisables, il est intéressant d'ajouter à l'échantillon un élément plus facilement ionisable (césium, par exemple) qui déplacera l'équilibre précédent vers la gauche. C'est ce qu'on appelle un tampon d'ionisation.

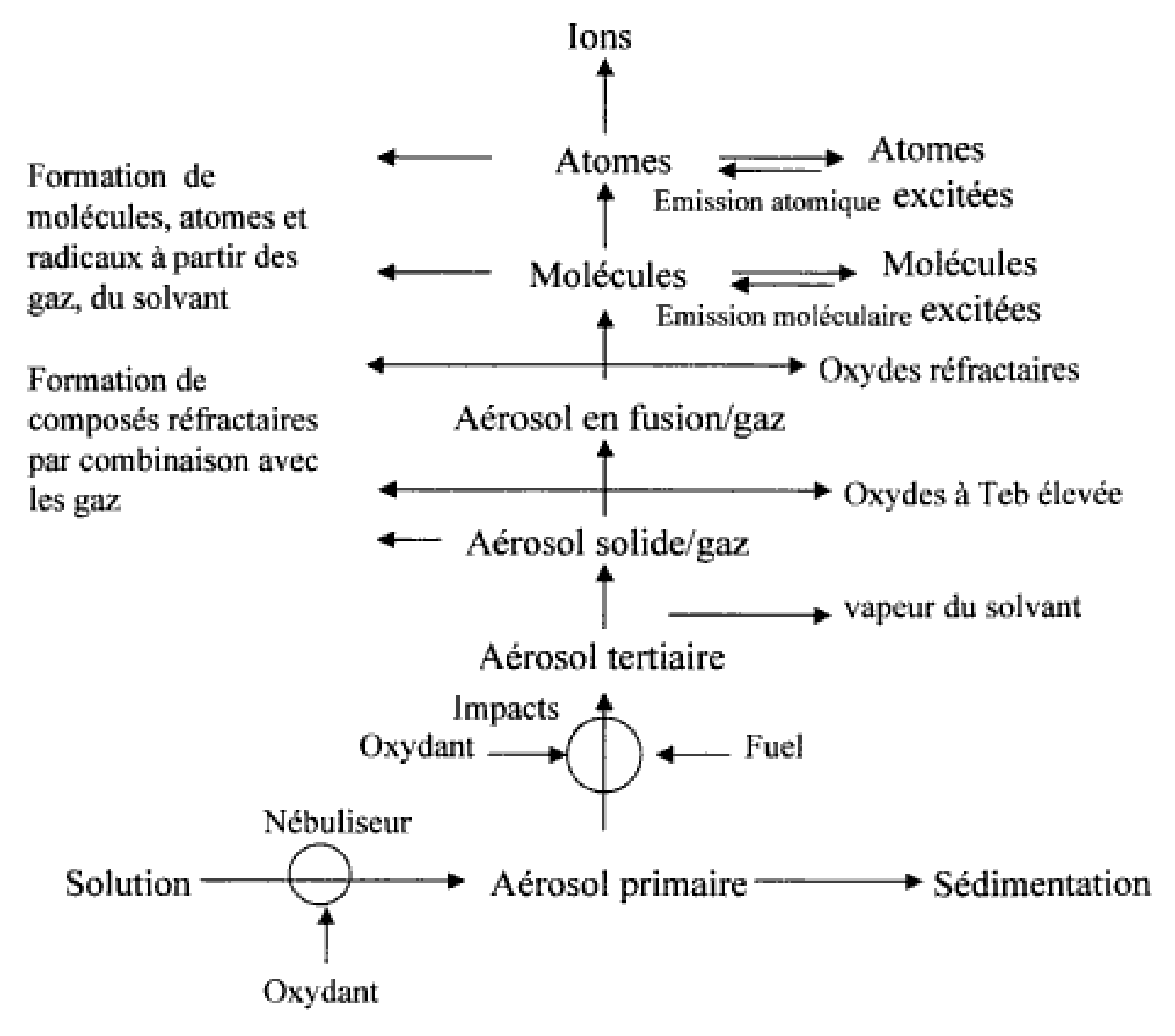


Figure 3. Phénomènes intervenant dans une flamme

D. Interférences

On peut distinguer plusieurs types d'interférences :

- spectrales : recouvrement de raies atomiques ; elles sont peu nombreuses et ne concernent aucune des raies de résonance.
  Absorptions moléculaires (halogénures) ou diffusion de la lumière par des particules solides.
  La correction de ces interférences, souvent mineures en biologie, s'effectue par l'utilisation d'une lampe à deutérium ou par effet Zeeman. Ces deux systèmes seront détaillés dans le paragraphe consacré à la SAAET.
  L'émission de lumière par la flamme elle-même est réduite par l'utilisation de fentes et l'emploi d'un système dispersif efficace. On peut l'éliminer par l'ajout

d'un chopper qui coupe à intervalles de temps réguliers le faisceau de la lampe. L'émission de lumière par la flamme peut alors être mesurée et comparée au signal total ;
- transport de l'échantillon : la viscosité diminue le débit. Ce phénomène peut être corrigé par l'emploi d'une pompe péristaltique. La tension de surface modifie la taille des gouttelettes ;
- en phase vapeur : processus d'atomisation et ionisation (*cf. chapitre précédent*).

E. Applications de la SAAF

La SAAF est la plus ancienne technique (1955). Elle est actuellement parfaitement éprouvée. Ses avantages sont un prix relativement modeste, une grande simplicité d'emploi et sa rapidité. En revanche, elle est peu sensible et ne permet de doser que quelques éléments dans les milieux biologiques : Ca, Fe, Mg, Li, Cu, Zn. De plus, elle consomme un grand volume d'échantillon (jusqu'à 1 mL). Enfin, c'est une technique monoélémentaire mais cela est peu gênant en biologie où il est peu fréquent que l'on ait à doser plusieurs éléments sur un même échantillon.
C'est une technique encore très répandue, mais qui est souvent remplacée par des techniques plus polyvalentes comme la SAAET ou l'ICP.

IV. Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique

A. Principe

Le principe est le même que celui de la SAAF mais le brûleur est ici remplacé par un dispositif de chauffage électrothermique constitué d'un four en graphite chauffé par effet joule. L'analyse est ici discontinue, contrairement à la SAAF. Toutes les étapes, depuis l'introduction de l'échantillon jusqu'à l'atomisation (pendant laquelle se fait la lecture), vont ici être contrôlées au niveau de la température grâce à la programmation d'étapes successives (*cf. « Programme thermique »*).

B. Appareillage

1. Introduction de l'échantillon

L'échantillon, typiquement entre 5 et 20 µl, parfois plus, est introduit en une ou plusieurs fois dans le four grâce à un capillaire. Certains dispositifs permettent l'analyse d'échantillons sous forme de suspensions (poudres) ou de solides, ce qui évite leur mise en solution préalable. L'échantillonneur, entièrement automatisé, permet le dépôt simultané ou séquentiel d'un diluant, d'étalons ou de réactifs tels les modificateurs de matrice (*cf. « Interférences »*).

2. Atomiseur

Le four est un cylindre creux en graphite de 2 à 3 cm de long et de 0,5 cm de diamètre, muni sur le dessus d'un orifice pour l'introduction du liquide. Tous les fours actuels sont revêtus d'une couche de carbone pyrolytique dont la structure cristalline rend le four moins poreux et plus résistant à l'usure. Certains fours (*fig.* 4) comportent en plus une plate-forme soit insérée, soit usinée directement dans le four (plate-forme intégrée) destinée à recevoir l'échantillon. En son absence, celui-ci est déposé directement sur la paroi du four. Les plates-formes insérées sont en carbone pyrolytique et donc très résistantes.

Le four est placé entre deux électrodes de graphite qui vont assurer son chauffage par effet joule. Jusqu'à récemment, les électrodes étaient placées à chaque extrémité du four. Le four ainsi chauffé longitudinalement présente un gradient de température, le centre étant plus chaud que les extrémités. Cette hétérogénéité de température est un handicap dans le processus d'atomisation car l'échantillon ne sera pas vaporisé de façon uniforme. L'introduction de la plate-forme par L'Vov a permis de réduire ce phénomène car celle-ci, du moins en théorie, n'est pas chauffée par contact mais par radiation à partir des parois du four. Il en résulte une température au niveau de la plate-forme plus homogène et, surtout, inférieure à celle de l'atmosphère à l'intérieur du four. Sans entrer dans le détail, cela évite les phénomènes de recondensation parfois observés en atomisation de paroi : c'est le concept STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*).

Notons que la plate-forme intégrée qui présente moins de contact avec la paroi du four améliore encore ce concept. Enfin, sont apparus plus récemment des fours chauffés transversalement. Dans ce cas, le chauffage est assuré tout le long du four, ce qui accroît l'homogénéité de température.

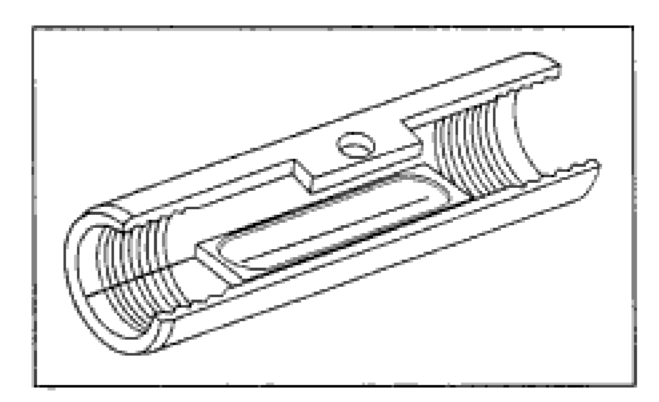
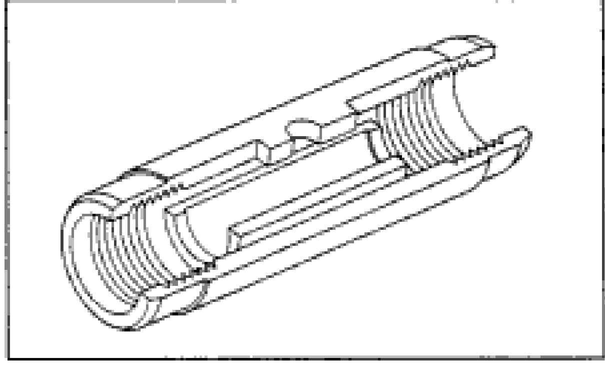



Figure 4. Schémas de fours à plate-forme (document PerkinElmer)

Le four est en permanence balayé à l'intérieur par un courant d'argon qui le protège de l'action de l'air aux températures élevées, maintenant ainsi son intégrité. L'argon peut être remplacé par un autre gaz, le plus souvent de l'air ou de l'oxygène, lors de certaines étapes, afin de favoriser la combustion des matières organiques. Cela est particulièrement utile lors de l'analyse du plasma ou du sang total pour réduire la formation de résidus carbonés issus de la pyrolyse des protéines. Toutefois, l'usage d'air ou d'oxygène entraîne une usure prématurée du four. Certains constructeurs ont introduit un second circuit d'argon à l'extérieur du four qui améliore sa protection contre l'air ambiant.

π

σ+ σ-

Les composantes σ apparaissent polarisées linéairement

Composantes σ polarisées circulairement

A

Composante π polarisée linéairement

Champ magnétique

Faisceau de mesure

Faisceau de mesure

Composantes σ polarisées circulairement

B

Composante π polarisée linéairement

Champ magnétique

π

σ+ σ-

La composante π n 'est pas vue

Figure 5. Effet Zeeman transversal (A) et longitudinal (B) (d'après PerkinElmer)

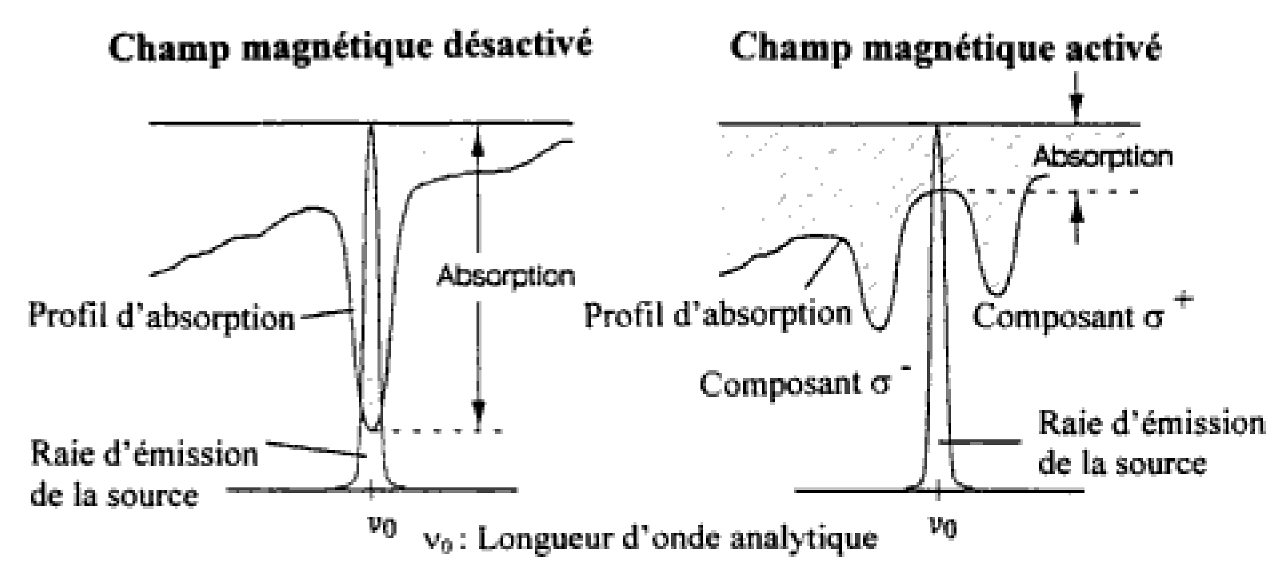


Figure 6. Représentation schématique de la correction de fond par effet Zeeman longitudinal (document PerkinElmer).

V. Spectrométrie d'émission atomique en flamme (photométrie de flamme)

A. Principe

Comme en SAAF, l'échantillon sous forme liquide est introduit dans une flamme, mais celle-ci sert aussi à exciter les atomes libérés. L'intensité de la lumière émise lors du retour à l'état fondamental est proportionnelle à la concentration de l'élément dans la solution.

B. Appareillage

L'introduction de l'échantillon est similaire à la SAAF. Une pompe péristaltique permet d'aspirer simultanément l'échantillon, un diluant et un standard interne. La flamme est le plus souvent produite par le mélange air/propane (≈ 1 900 °C) pour le dosage du sodium, du potassium et du lithium. Les processus intervenant dans la flamme sont les mêmes que ceux décrits en SAAF. L'observation se fait au niveau du panache qui est plus stable. Comme il a été mentionné dans les généralités, la proportion d'atomes excités est toujours très faible et le phénomène d'émission n'est quantifiable que pour les alcalins, voire les alcalino-terreux. La température relativement basse de la flamme limite l'émission due aux autres éléments. En conséquence, un système de filtres, moins onéreux qu'un réseau, suffit pour sélectionner les longueurs d'onde intéressantes. L'ionisation est un phénomène parasite mais elle reste mineure à cette température (< 2 % des atomes).
Afin de pallier les fluctuations de la pompe péristaltique et de la flamme, on introduit généralement un standard interne en concentration constante dont l'émission sera mesurée simultanément à celle de l'élément dosé. Par exemple, le lithium est utilisé pour le dosage du sodium et du potassium, et le potassium est utilisé pour le dosage du lithium. Le césium peut servir de standard interne unique pour ces trois éléments.

C. Applications

En biologie clinique, la photométrie de flamme est réservée au dosage du sodium, du potassium et du lithium dans le sang et l'urine. Cette technique est en retrait depuis l'apparition d'électrodes spécifiques du sodium et du potassium.

VI. Spectrométrie d'émission atomique en plasma couplé induit haute fréquence (ICP-OES)

A. Principe

Le principe est identique à la photométrie de flamme mais cette dernière est ici remplacée par une source thermique beaucoup plus énergétique, un plasma d'argon.

En physique, un plasma est un gaz totalement ionisé, électriquement neutre. En ICP, ce plasma est créé par un champ électromagnétique à haute fréquence produit par une bobine d'induction, alimentée par un générateur haute fréquence. Un flux d'argon qui traverse ce champ est partiellement ionisé (~ 10^{-4}) et forme le plasma. L'énergie du générateur va accélérer les atomes et les électrons qui subissent de nombreuses collisions, provoquant l'échauffement du plasma. La température de celui-ci varie selon la zone d'observation de 3 000 à 10 000 K. Dans de telles conditions de température, les phénomènes d'excitation concernent la plupart des éléments, ce qui étend les possibilités analytiques de cette technique. Le spectre d'émission, très riche, est composé de raies I et de raies II (*cf. « Aspects théoriques : Excitation »*) de l'argon et des éléments contenus dans l'échantillon ainsi que de bandes moléculaires, principalement des bandes OH.

B. Appareillage

1. Le nébuliseur

L'échantillon liquide est introduit dans le plasma sous forme d'aérosol grâce à un nébuliseur couplé à une chambre de nébulisation. Il existe de nombreux types de nébuliseurs et de chambres car l'introduction de l'échantillon constitue en ICP un paramètre fondamental, en pleine évolution technologique. Le choix de tel ou tel type de nébuliseur est conditionné par la nature de l'échantillon, le volume disponible et la sensibilité recherchée.
On distingue les nébuliseurs pneumatiques, dans lesquels le liquide est aspiré et fragmenté par un flux de gaz, et les nébuliseurs ultrasoniques. Les premiers, de loin les plus courants, peuvent être concentriques, à flux croisés ou en V. Ce type de nébuliseur est raccordé à une chambre de nébulisation qui sélectionne les gouttelettes les plus fines. Leur rendement est toujours très faible, de l'ordre de quelques pour cent. Des améliorations ont permis d'obtenir une sensibilité équivalente, tout en réduisant la consommation d'échantillon (micronébuliseur). Une injection directe de l'aérosol dans le plasma est parfois utilisée.
Le nébuliseur ultrasonique fonctionne selon un processus différent. L'échantillon est introduit à la surface d'un quartz piézo-électrique vibrant à très haute fréquence. Le liquide est immédiatement transformé en un aérosol extrêmement fin. Le rendement de nébulisation est très élevé, ce qui oblige à désolvater l'aérosol avant son introduction dans le plasma. La sensibilité obtenue avec ce type de nébuliseur est très importante mais son coût élevé le réserve à des laboratoires spécialisés. De plus, il s'applique mal aux solutions chargées (liquides biologiques) qui nécessitent une dilution préalable.

2. La torche

C'est elle qui permet de créer le plasma (*fig. 7*). Elle est constituée de trois tubes concentriques : l'injecteur central qui véhicule l'aérosol jusqu'à la base du plasma, le tube intermédiaire et le tube externe, tous les deux en quartz. Le flux d'argon plasmagène, d'environ 12 l/mn, circule entre le tube intermédiaire et le tube externe. Il

crée le plasma et refroidit le tube externe en l'isolant du plasma. Un flux de gaz auxiliaire (Ar) entre le tube interne et l'injecteur permet, pour certaines applications, de soulever légèrement le plasma. L'extrémité supérieure de la torche est placée à l'intérieur des spires de la bobine d'induction ; c'est à ce niveau que se forme le plasma.

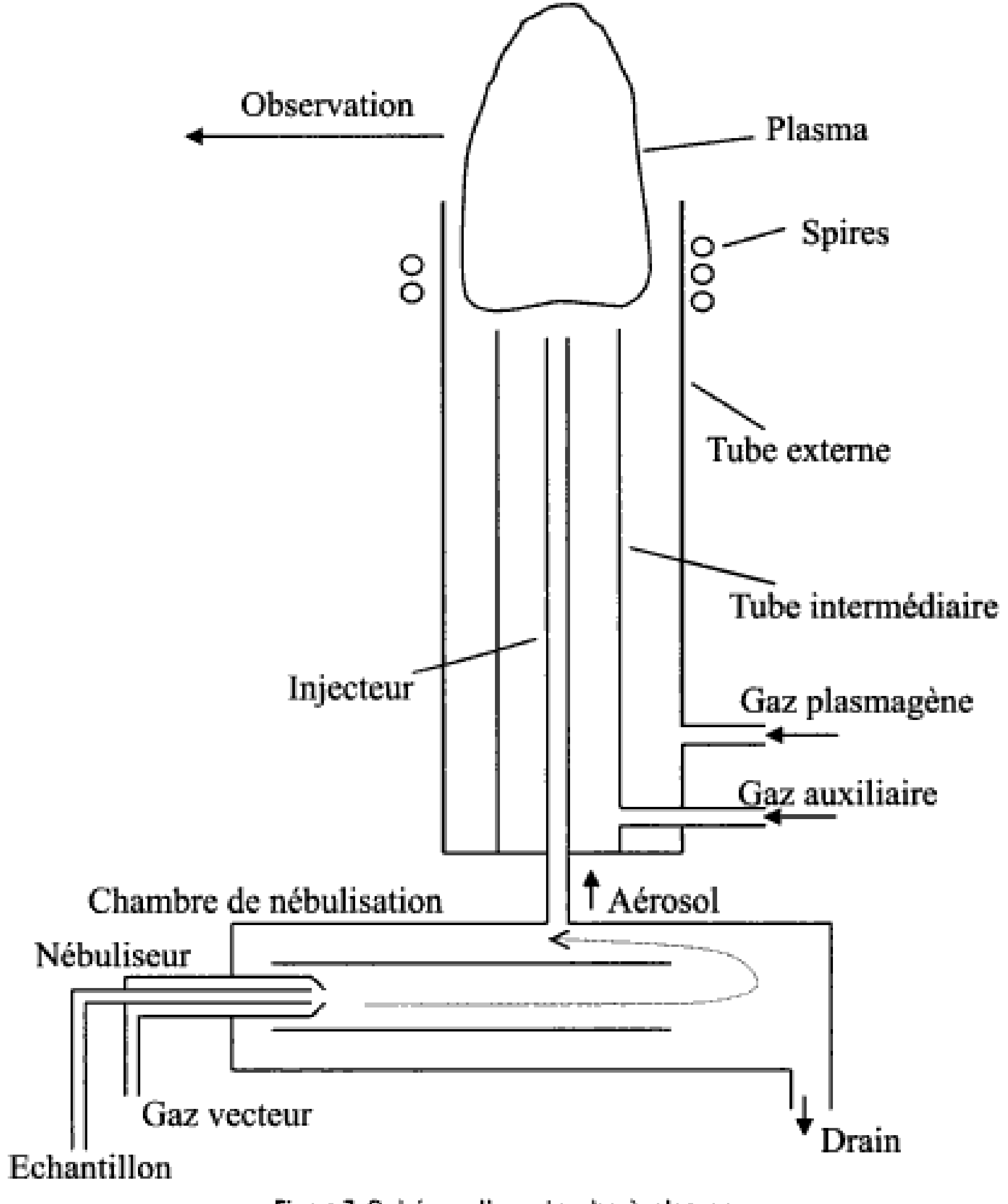


Figure 7. Schéma d'une torche à plasma

3. Optique et détecteur

Une partie du rayonnement émis par le plasma est focalisée grâce à une lentille dans le système optique. Le faisceau arrive sur un réseau qui permet de séparer les différentes longueurs d'onde. La lumière est ensuite captée par le détecteur dont il existe deux types : les photomultiplicateurs (PM), qui ne permettent qu'une lecture à la fois, et les capteurs CCD (*Coupled Charge Device*) qui analysent l'ensemble du spectre sur une matrice de capteurs.

Théorie de la chromatographie

E. CAVALLI, Y. GUILLAUME
Laboratoire de chimie analytique, UFR des sciences pharmaceutiques et médicales, Besançon.
P. LEFEBVRE, UFR des Sciences pharmaceutiques, Paris V (révision 2007).

haute pression ou CLHP), et les supports de phase stationnaire de très faible granulométrie (chromatographie liquide haute performance, également abrégée en CLHP).
Au-delà des applications traditionnelles de chimie préparative, la chromatographie, sous ses différentes formes, est devenue une technique totalement incontournable de la chimie analytique moderne :

- *analyse qualitative avec des couplages de plus en plus variés : spectrométrie de masse, RMN, infrarouge... ;*
- *analyse quantitative avec des limites de détection aussi faibles que la femtomole par litre (fmole/L).*

L'avenir de la chromatographie liquide appartient peut-être à l'électrochromatographie : combinaison de la CLHP et de l'électrophorèse capillaire.

I. Types de chromatographie

On peut distinguer les différents types de chromatographie selon 3 critères : géométrie du support de la phase stationnaire, état de la phase mobile et nature de la phase stationnaire (ou type d'équilibre).

A. Géométrie du support de la phase stationnaire

1. Chromatographie sur colonne

La phase stationnaire est contenue (ou fixée) à l'intérieur d'un tube dans lequel circule la phase mobile. L'échantillon est introduit en amont de la colonne et la détection se fait en aval : on parle alors d'élution.
On trouve dans cette catégorie CG, CLHP et chromatographie en fluide supercritique (CFS).

2. Chromatographie planaire

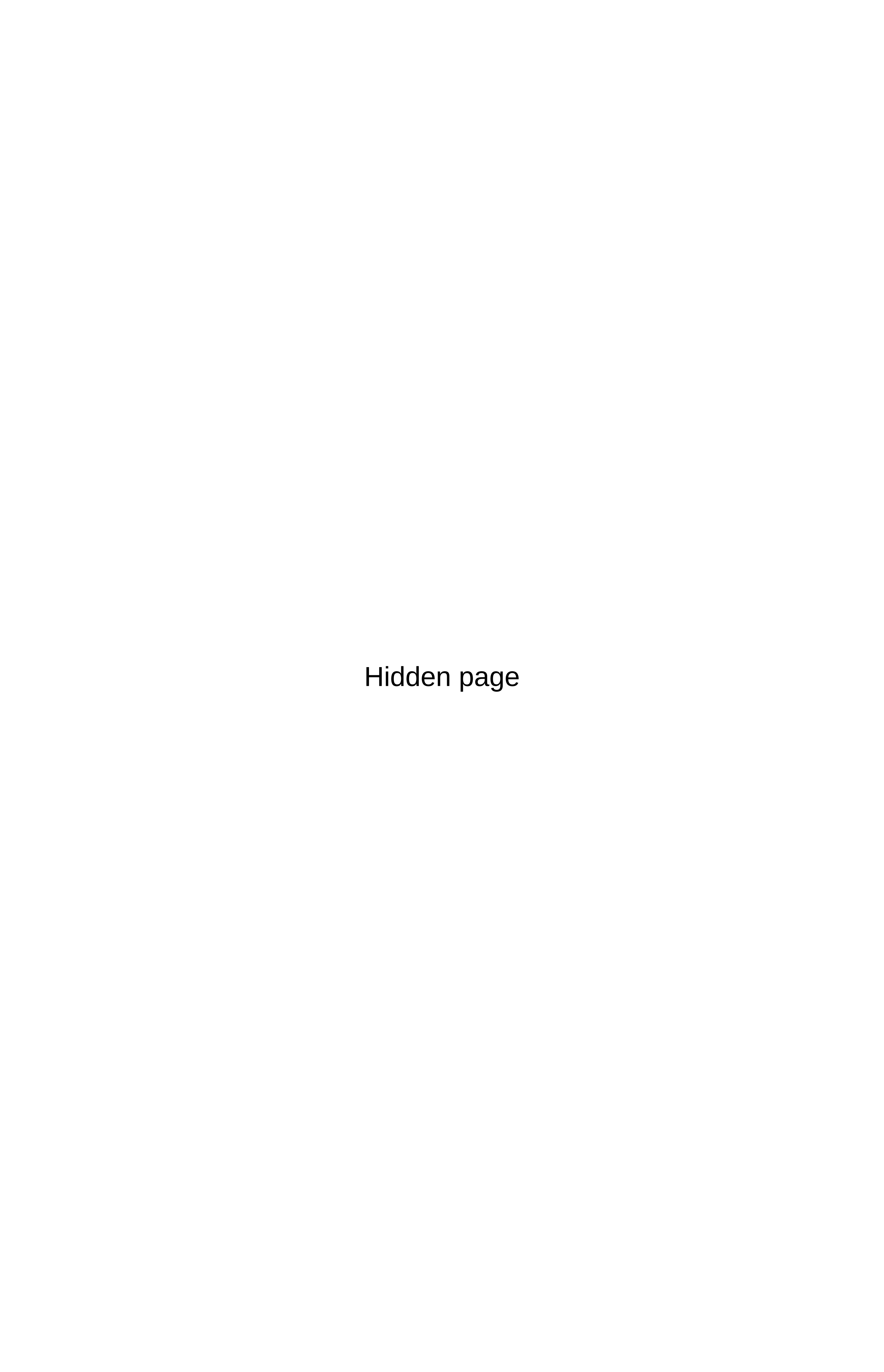
En chromatographie sur couche mince (CCM), la phase stationnaire (ou le support solide de la phase stationnaire si elle est liquide) est répartie en une fine couche sur un support plat inerte (aluminium, verre...). En chromatographie sur papier, la phase stationnaire liquide est immobilisée à l'intérieur des pores d'une feuille de cellulose.
L'échantillon est ici déposé sur la plaque (ou la feuille) et détecté soit directement en lumière naturelle ou sous UV (lecture), soit après dérivation chimique (révélation) également sur la plaque : en chromatographie planaire, on parle de développement.

B. État de la phase mobile

La phase mobile peut se présenter dans chacun des 3 états caractérisant un fluide.

1. Liquide

La phase mobile est généralement constituée d'un mélange de solvants, ou de tampons, et de divers adjuvants (agents complexants, par exemple). La CLHP et la chromatographie planaire font partie de la chromatographie liquide.



Les données importantes relevées sur le chromatogramme sont :

- le temps mort, t_0. Il est obtenu en injectant un composé qui n'est pas retenu par la phase stationnaire (le nitrate de sodium en CLHP en phase inverse, par exemple). Il rend compte du temps mis par la phase mobile pour traverser le système chromatographique, de l'injecteur au détecteur ;
- le temps de rétention, t_R. Il est mesuré au sommet du pic et représente le temps moyen mis par l'analyte pour traverser le système chromatographique ;
- la hauteur du pic, h_p, et la surface sous le pic (en hachuré). Ces grandeurs sont proportionnelles à la quantité d'analyte (*cf. « Analyse quantitative »*) ;
- les largeurs du pic, $\omega_{0.5}$ à mi-hauteur et ω_b à la base du pic. Remarque : ω_b est mesurée à l'intersection de la ligne de base et des tangentes passant par les points d'inflexion du pic.

III. Déplacement des analytes

A. Coefficient de distribution

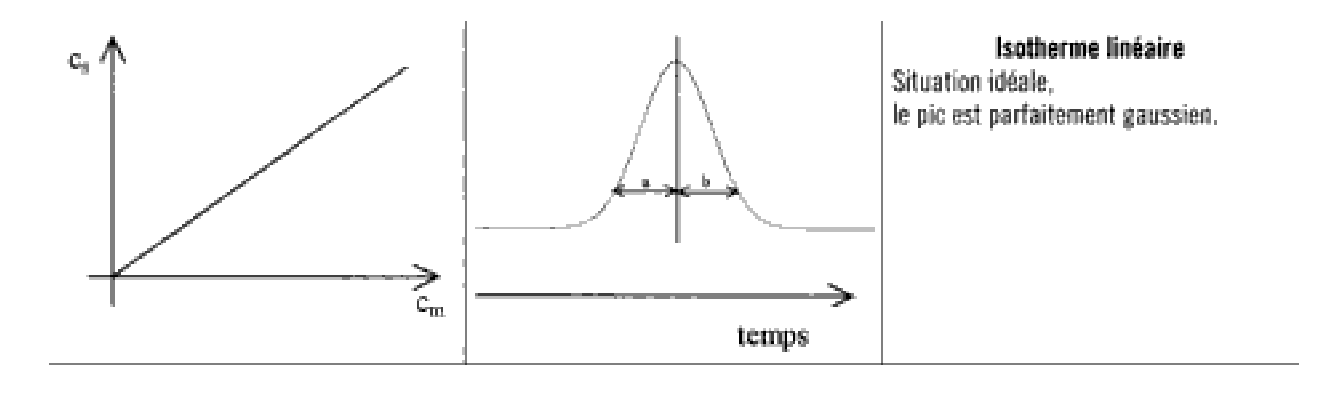
Quelle que soit la nature de l'échange mis en jeu entre les deux phases chromatographiques (partage, adsorption...), on peut écrire K, le coefficient de distribution auquel se rapporte cet échange :

$$K = \frac{c_s}{c_m} \qquad (1)$$

où c_s et c_m sont les concentrations de l'analyte, respectivement dans les phases stationnaire et mobile [8].

Idéalement, à une température donnée, K ne dépend ni de c_s ni de c_m : c'est un isotherme de distribution linéaire. Dans la plupart des cas réels, cela n'est vrai que sur des gammes de concentrations réduites.

On observe deux types d'isothermes de distribution non-linéaire : convexe ou concave.



8. En chromatographie d'adsorption, on remplace le c_s par le nombre de moles d'analyte adsorbé par gramme d'adsorbant (c'est-à-dire de phase stationnaire), x_s

Le profil gaussien traduit donc l'influence de ces facteurs aléatoires et indépendants sur le comportement individuel des molécules. Les pics non-gaussiens montrent, eux, l'intervention de facteurs d'élargissement non aléatoires : la concentration sur le coefficient de distribution par exemple.
Deux approches se sont particulièrement distinguées dans l'étude de la nature et de l'influence de ces facteurs : la théorie des plateaux d'abord, puis la théorie cinétique.

A. La théorie des plateaux

Cette théorie a été présentée dans les années 1940 par Martin et Synge [12]. Bien que largement dépassée, elle conduit à des paramètres universellement employés pour décrire l'efficacité des systèmes chromatographiques. Il est donc important d'en connaître le principe.
Dans ce modèle, la colonne de longueur L est assimilée à une série de N sections interconnectées mais indépendantes : les plateaux théoriques.
La taille des plateaux, H, est appelée hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) :

$$H = \frac{L}{N} \qquad (6)$$

Chaque plateau contient 1/N^{me} de la phase mobile et de la phase stationnaire.
Le déplacement, normalement continu, de la phase mobile, est décomposé en étapes :
- progression d'un cran de la phase mobile ;
- équilibrage instantané des concentrations du soluté entre les deux phases de chaque plateau suivant le coefficient de distribution ;
- nouvelle progression.

Les *tableaux* suivants présentent une simulation simplifiée de ce principe : le soluté n'occupe à l'injection qu'un plateau théorique, sa concentration et le coefficient de distribution sont égaux à 1.

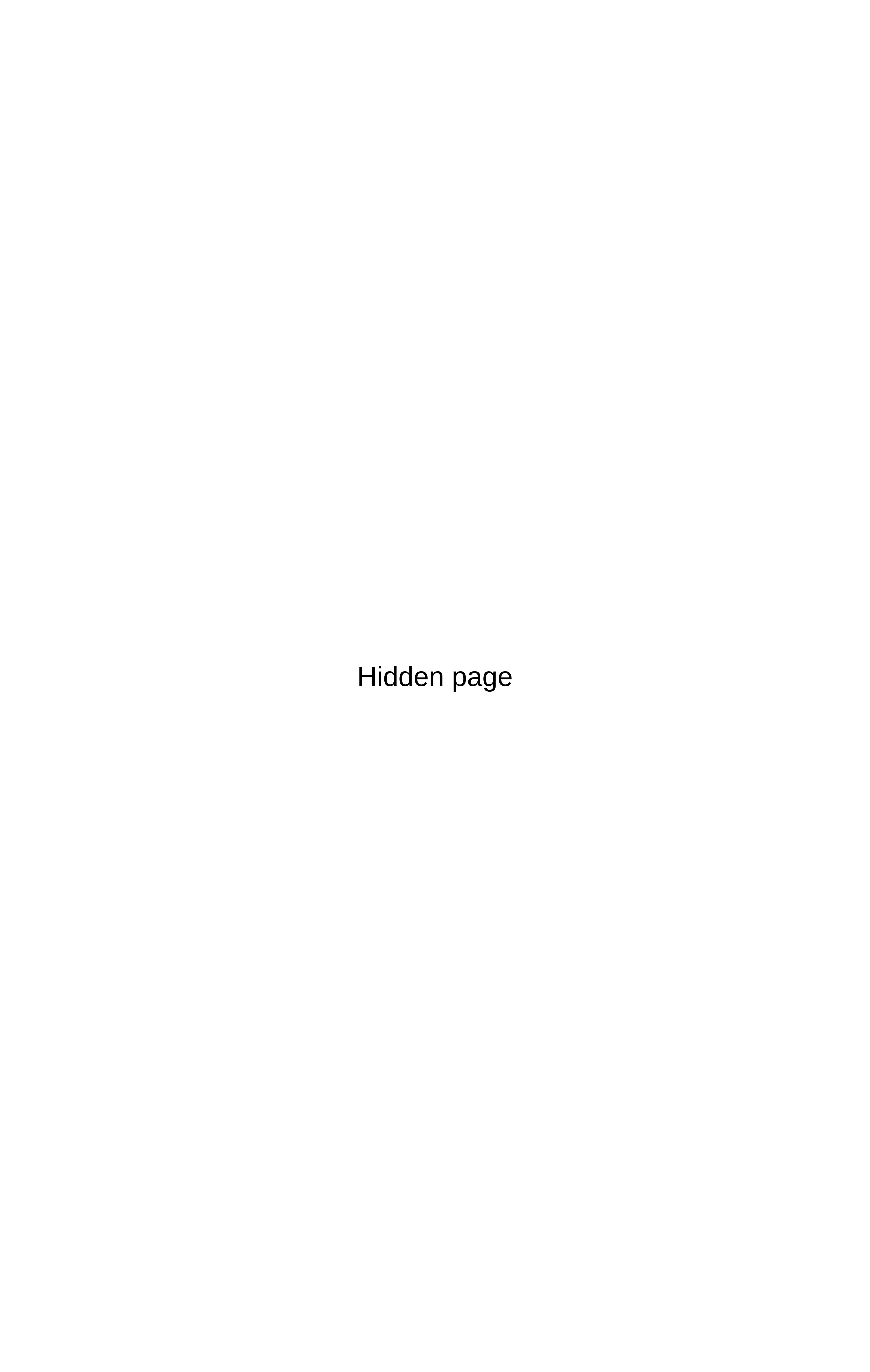
Étape 1

Progression		Équilibre	
C_m	C_s	C_m	C_s
1	0	1/2	1/2
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Étape 2

Progression		Équilibre	
C_m	C_s	C_m	C_s
0	1/2	1/4	1/4
1/2	0	1/4	1/4
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

12. Martin A.-P.-J., Synge R.-L.-M., *Biochem. J.* 1952 ; 50 : 679.


Hidden page

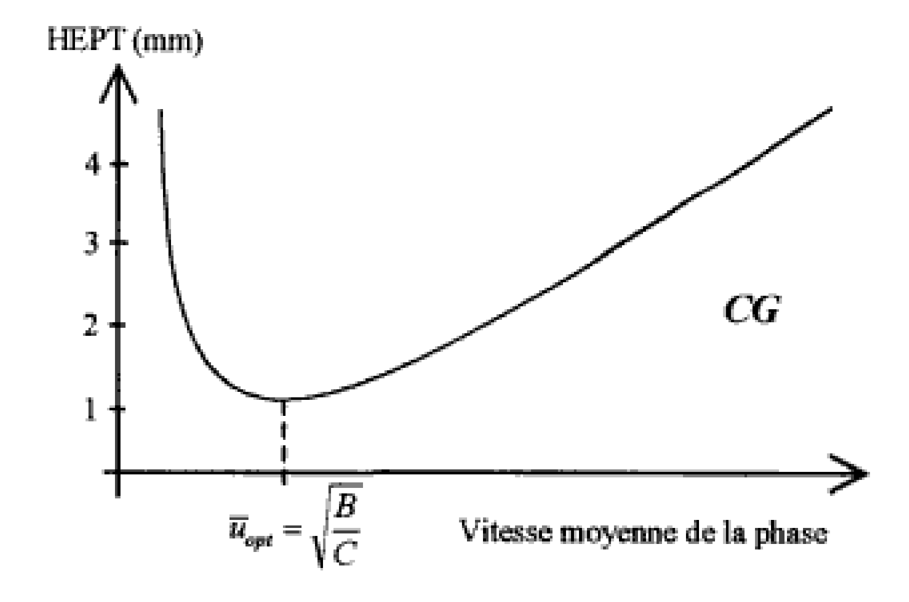
Ces équations (ainsi que les autres formes, d'ailleurs) décrivent des hyperboles comme on peut le voir dans la *figure 10*.

Ces courbes présentent un minimum correspondant à un maximum d'efficacité de la colonne et à une vitesse dite optimale : u_{opt}.

Il convient toutefois d'utiliser cette notion de vitesse optimale avec circonspection :

- d'abord, les équations ayant servi à construire ces courbes montrent très clairement que la nature du soluté utilisé influe sur les paramètres de la courbe, donc sur la valeur de u_{opt}. Chaque courbe est propre à un composé, et chaque composé a sa propre vitesse optimale (la variation de u_{opt} est, il est vrai, généralement faible) ;
- ensuite, la vitesse optimale n'est pas nécessairement la vitesse la plus adéquate pour travailler. Opérer à des vitesses plus élevées peut faire gagner beaucoup de temps sans que la diminution d'efficacité soit préjudiciable. C'est particulièrement vrai en CLHP où les valeurs de u_{opt} sont trop faibles pour être effectivement utilisables.

La très forte différence de HEPT entre la CLHP et la CG (entre 100 et 1 000 fois inférieure) est largement compensée par la différence de longueur de colonne : en CG, les colonnes capillaires actuelles font plusieurs dizaines de mètres alors que les colonnes de CLHP font, au plus, quelques dizaines de centimètres. On obtient ainsi des systèmes ayant sensiblement le même nombre de plateaux théoriques, donc d'efficacité similaire.



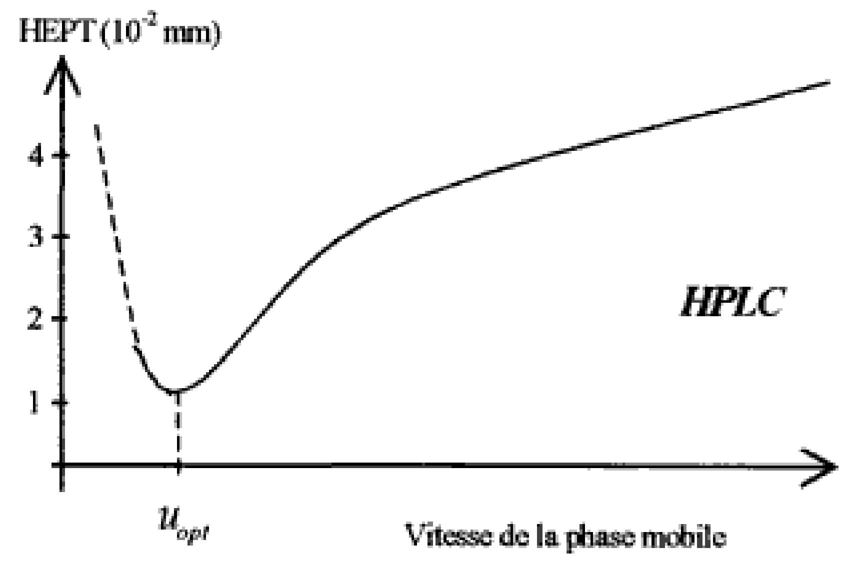


Figure 10. Représentation graphique des équations (22) et (23)

7. Applications de la théorie cinétique

Le travail effectué sur la compréhension de l'efficacité a eu un impact profond sur la conception du matériel chromatographique.

Les concepteurs de matériel (pompes, injecteurs, colonnes et détecteurs) ont su grandement tirer parti des résultats de la théorie cinétique pour augmenter l'efficacité de leurs matériels :

- réduction au minimum des volumes morts de l'injecteur, du détecteur et de la tuyauterie ;
- amélioration des temps de réponse des détecteurs ;
- réduction et contrôle précis de l'épaisseur du film de phase stationnaire en chromatographie de partage — d_f de l'équation (21) ;
- réduction de la taille et de la dispersion de la taille des particules — r ou d_p des équations (19) et (21).

En CLHP, cette volonté d'optimisation de l'efficacité a donné naissance à la chromatographie à grande vitesse et à la microchromatographie.

La première technique utilise des particules de rayon de 1,5 µm. L'efficacité s'en trouve grandement améliorée puisque, comme le montre l'équation (21), la taille des particules intervient au carré sur la HEPT. Malheureusement, cette réduction du diamètre des particules d_p s'accompagne d'une forte augmentation de la perte de charge Δp à travers la colonne (la pression nécessaire pour faire circuler la phase mobile à une vitesse donnée doit être beaucoup plus élevée) exprimée par la loi de Darcy :

$$\Delta p = \varphi \cdot \eta \cdot L \cdot u / d_p^2 \qquad (24)$$

où φ est le facteur de résistance à l'écoulement et η la viscosité de la phase mobile. Pour travailler avec des pressions d'entrée de colonne compatibles avec le matériel actuel, il faut réduire la longueur de la colonne, donc limiter le gain d'efficacité attendu. Ces colonnes raccourcies et des débits de phases mobiles élevés (entre 4 et 5 mL/min pour un diamètre de 3 µ) conduisent à des temps d'analyse relativement courts. En conclusion, la chromatographie à grande vitesse est surtout utilisée pour l'analyse de routine de mélanges faciles à résoudre.

La seconde technique, la microchromatographie, utilise le fait que la recherche d'une efficacité optimale passe aussi par une diminution du diamètre de la colonne.

Sur ces bases, des colonnes capillaires, remplies ou non (de diamètre < 0,1 mm), et des microcolonnes (diamètre compris entre 0,5 et 1 mm) ont été proposées en chromatographie liquide. Le développement des colonnes capillaires soulève d'importantes difficultés technologiques. La voie la plus prometteuse est caractérisée par l'utilisation de microcolonnes de 1 à 2 mm de diamètre intérieur et de 15 à 100 cm de longueur. Ce type de colonne atteint un million de plateaux et permet l'utilisation de microdébits (de l'ordre de 30 µL/min au lieu de 1 000 µl/min pour les colonnes classiques).

L'emploi de microdébits permet non seulement de réduire la quantité de solvant utilisée, donc le coût de l'analyse, mais aussi un couplage direct avec la spectrométrie de masse. Un autre avantage de la microchromatographie est l'augmentation de la sensibilité en réduisant au maximum la dilution produite lors de l'injection du soluté à l'intérieur du système chromatographique.

V. Grandeurs de séparation

Plusieurs grandeurs sont utilisées pour caractériser la différence de comportement de deux solutés A et B dans un système chromatographique donné. Les plus couramment employées sont la sélectivité et la résolution.

A. Sélectivité

La sélectivité (α) représente essentiellement la différence de comportement entre les coefficients de distribution des composés A et B vis-à-vis des deux phases, mobile et stationnaire, du système chromatographique étudié. Ce facteur, appelé aussi facteur de rétention relative, est égal au rapport des coefficients de distribution K_A et K_B des deux solutés A et B, il est donné par :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R(B)} - t_0}{t_{R(A)} - t_0} \tag{25}$$

Il est évident, d'après cette dernière équation, que lorsque les coefficients de distribution sont égaux, $\alpha = 1$ et les pics de A et de B sont confondus. Par principe, le facteur de capacité k du composé le plus retenu est placé au numérateur : α est donc toujours supérieur ou égal à 1.
Par des considérations thermodynamiques, on démontre que :

$$\ln\alpha = \frac{-\Delta(\Delta G^\circ)}{RT} \tag{26}$$

$\Delta(\Delta G^\circ)$ représente la différence des enthalpies libres de distribution des deux composés soit $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_B - \Delta G^\circ_A$, R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue.
Cette différence résulte de l'ensemble des interactions spécifiques, ioniques ou moléculaires, auxquelles les solutés sont soumis au niveau de la phase stationnaire et de la phase mobile.
On peut également écrire :

$$\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta(\Delta H^\circ) - T\Delta(\Delta S^\circ) \tag{27}$$

$\Delta(\Delta H^\circ)$ et $\Delta(\Delta S^\circ)$ représentent les différences d'enthalpie et d'entropie de distribution des deux composés soit $\Delta H^\circ_B - \Delta H^\circ_A$ et $\Delta S^\circ_B - \Delta S^\circ_A$.
En combinant les équations (26) et (27) on obtient :

$$\ln\alpha = -\frac{\Delta(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S^\circ)}{R} \tag{28}$$

Dans le cas où les diverses interactions se produisent avec une enthalpie constante dans le domaine de température étudié, l'équation (28) montre que $\ln\alpha$ en fonction de 1/T est une droite. $\Delta(\Delta H^\circ)$ et $\Delta(\Delta S^\circ)$ pourront alors être calculés à partir de sa pente et de son ordonnée à l'origine.
D'une manière théorique, l'équation (28) montre que pour $\alpha = 1$ la température est égale à $\Delta(\Delta H)/\Delta(\Delta S)$.
Cette valeur notée T_i s'appelle température d'inversion de l'ordre d'élution des pics A et B pour le système chromatographique étudié.

Pour $T < T_i$ B est élué après A, pour $T = T_i$ les pics A et B sont confondus et pour $T > T_i$ A est élué après B.
Dans la pratique, l'inversion de l'ordre d'élution de A et de B est loin d'être systématiquement observée.
La sélectivité n'est toutefois pas toujours un critère satisfaisant pour évaluer la qualité de la séparation des composés, cette grandeur ne tenant pas compte de la forme des pics chromatographiques, notamment de leurs largeurs. Il est donc nécessaire d'introduire un autre critère de séparation : la résolution.

B. Résolution

Cette grandeur séparative notée R_s permet donc d'apprécier réellement la qualité de la séparation de deux pics chromatographiques. Ce terme prend en effet en compte, outre la rétention relative de chacun des 2 solutés (donc la sélectivité), le retour ou l'absence de retour à la ligne de base des pics chromatographiques (donc l'efficacité).

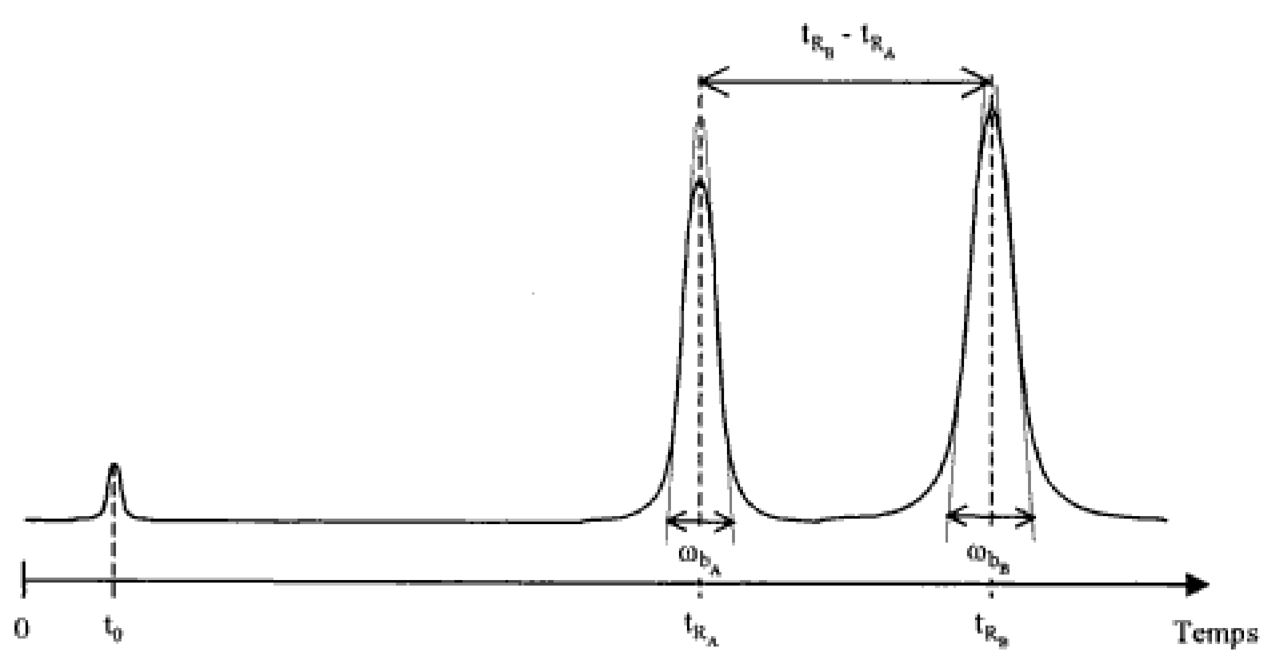


Figure 11. Représentation graphique de la résolution

La résolution peut être déterminée graphiquement en appliquant la relation :

$$R_s = 2\frac{(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{\omega_{b,B} + \omega_{b,A}} = 1,18 \cdot \frac{(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{\omega_{0,5,B} + \omega_{0,5,A}} \quad (29)$$

La séparation s'améliore avec l'augmentation de R_s. La séparation des 2 pics est nettement insuffisante lorsque R_s est inférieur à 0,8. Elle devient satisfaisante dans le cadre de séparations rapides pour des valeurs de R_s égales à 1. Si l'on désire de meilleures séparations, R_s doit être supérieur à 1,5. En effet, pour R_s = 1,5 le chevauchement des pics n'est plus que d'environ 0,3 %.
Cette équation ne fait pas apparaître clairement l'influence des divers paramètres chromatographiques sur la qualité de la séparation.

B. Modification du facteur de capacité

L'équation (30) montre qu'une augmentation de k_B améliore souvent la résolution. L'augmentation de k_B a un effet limite puisque pour $k_B > 10$, le terme $k_B/1 + k_B$ tend vers 1 et le temps d'analyse s'allonge considérablement sans accroître notablement la valeur de la résolution. Les valeurs optimales de k_B sont généralement comprises entre 1 et 5.
Le moyen le plus usuel de modifier k_B est de faire varier la composition de la phase mobile, ou la température de la colonne en CG et en CLHP.
Ainsi, en chromatographie liquide en phase inversée, la phase mobile est généralement constituée par un mélange binaire hydroorganique eau/modificateur organique (les modificateurs organiques les plus souvent utilisés sont le méthanol ou l'acétonitrile). Une diminution de la fraction en modificateur organique et/ou de la température de la colonne induit en général une augmentation de la valeur de k_B donc une variation de la résolution.
Si la composition de la phase mobile et la température de la colonne sont modifiées pendant la phase d'élution des composés, on parlera alors de gradient de température et de gradient de composition, ou programmation de solvant.

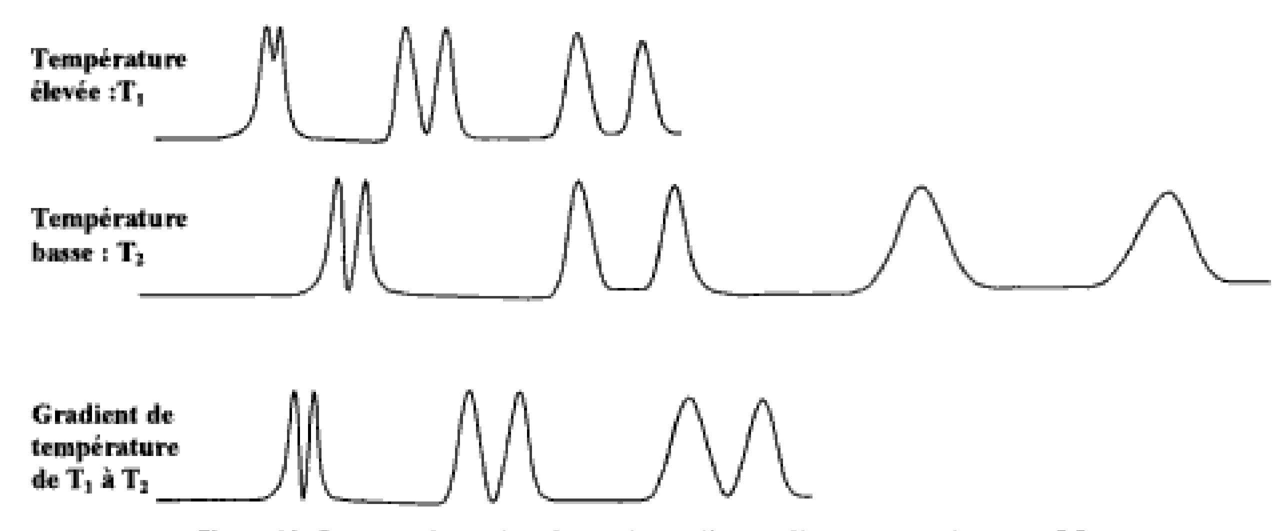


Figure 12. Comparaison de séparations d'un mélange complexe en CG, dans des conditions isothermes et en gradient de température

C. Modification du facteur de sélectivité

La sélectivité est un paramètre très puissant dans l'expression de R_s puisqu'il augmente le R_s selon le rapport $\alpha - 1/\alpha$. Le passage de $\alpha = 1,1$ à $\alpha = 1,2$ double pratiquement R_s. α est modifié par tout ce qui peut faire varier les coefficients de distribution des solutés : la nature de la phase stationnaire, de la phase mobile et de la température de la colonne.
Évidemment, ces facteurs chromatographiques sont liés entre eux et la modification d'un paramètre peut entraîner une variation sur chacun d'eux :

- une augmentation de la température, par exemple, va modifier l'efficacité du système (en mieux ou en moins bien), diminuer les facteurs de capacités et probablement modifier la sélectivité ;

- une augmentation du facteur de rétention permet en théorie d'améliorer la résolution, mais au prix d'une augmentation parfois très importante du temps d'analyse, etc.

Il est dans la pratique très compliqué d'optimiser simultanément tous les paramètres accessibles à l'opérateur. L'apparition sur le marché informatique de logiciels d'optimisation de séparations chromatographiques permet à l'heure actuelle de mieux appréhender ce problème.

VII. Applications

La chromatographie est employée tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative de composés individuels.

A. Analyse qualitative

Sur le chromatogramme, les divers composés dans un mélange ne sont caractérisés que par leur temps de rétention. L'utilisation de cette technique pour l'analyse qualitative d'échantillons complexes de composition inconnue est donc très limitée. Afin d'améliorer l'analyse qualitative, la sortie des colonnes chromatographiques est couplée directement avec d'autres appareils d'analyse plus spécifiques : spectromètre à barrette de diodes, IR à transformée de Fourier ou spectromètre de masse... Ces techniques couplées permettent une meilleure identification des substances avec une probabilité différente selon les procédés utilisés, et en choisissant si besoin des substances de référence.

Mais si un chromatogramme ne permet pas avec une certitude absolue d'identifier toutes les espèces présentes dans un mélange complexe, il permet souvent de s'assurer de l'absence d'un composé donné. En effet, si un échantillon ne donne pas de pic au temps de rétention d'une substance de référence, injectée dans les mêmes conditions expérimentales, alors le composé en question est absent ou présent à une concentration inférieure à la limite de détection du système.

B. Analyse quantitative

L'évaluation de la quantité Q d'une substance dans un mélange est fonction d'une mesure x. La relation obtenue est appelée fonction analytique et s'écrit :

$$Q = f(x) \qquad (31)$$

Pour qu'elle soit en même temps quantitative et non arbitraire, la fonction analytique doit être établie par une série de mesures d'étalonnage sur des échantillons de composition connue de la substance, et bien définie (étalons), placés par exemple en solution de composition définie (solution étalon).

Le procédé d'étalonnage fournit des valeurs de mesure x correspondant aux valeurs Q des divers étalons.

Dans la classification (*tab. 1*), on retrouve les alcanes et l'eau aux deux extrêmes, ainsi qu'une analogie de polarité entre dichlorométhane et dioxanne, alors que le premier est non miscible à l'eau et que le second l'est. Hildebrand a affiné sa classification en prenant en compte des interactions spécifiques qui définissent l'énergie de cohésion.

Tableau 1. Classement des principaux solvants utilisés en chromatographie de partage classique (*) et à polarité de phases inversée (**) selon le paramètre de solubilité de Hildebrand et la polarité selon Rohrschneider

Solvant	Limite inférieure d'utilisation du solvant en UV (nm)	Indice de réfraction à 25 °C	Eh (°C)	Viscosité eP, 25 °C	d	δ_p	δ_o	δ_a	δ_d	P'	Constante diélectrique
n-hexane (*)	190	1,372	69	0,30	7,3	7,3	0	0	0	0,1	1,88
n-heptane (*)	195	1,385	98	0,40	7,4	7,4	0	0	0	0,2	1,92
Isooctane (*)	197	1,389	99	0,47	7,0	6,9	0,5	0,5	0	0,1	1,94
Éther isopropylique (*)	220	1,365	68	0,38	7,0	6,9	0,5	0,5	0	2,4	3,9
Isopropanol (**)	205	1,384	82	1,9	10,2	7,2	2,5	4	4	3,9	20,3
Chlorure de méthylène (*)	233	1,421	40	0,41	9,6	6,4	5,5	0,5	0	3,1	8,9
Tétrahydrofuranne (*), (**)	212	1,405	66	0,46	9,1	7,6	4	3	0	4,0	7,6
Chloroforme (*)	245	1,443	61	0,53	9,1	8,1	3	0,5	3	4,1	4,8
Dioxanne (*), (**)	215	1,420	101	1,2	9,8	7,8	4	3	0	4,8	2,2
Éthanol (*), (**)	210	1,359	78	1,08	11,2	6,8	4,0	5	5	4,3	24,6
Méthanol (*), (**)	205	1,326	65	0,54	12,9	6,2	5	7,5	7,5	5,1	32,7
Acétonitrile (*), (**)	190	1,341	82	0,34	11,8	6,5	8	2,5	0	5,8	37,5
Eau (**)		1,333	100	0,89	21	6,3	grand	grand	grand	10,2	80

B. Les interactions

Les interactions soluté-solvant sont difficiles à prévoir, on considère qu'elles sont de quatre types.

1. Force de dispersion

La répartition des électrons d'une molécule de soluté peut être à un moment dissymétrique, créant un moment dipolaire qui peut polariser les électrons de la molécule de solvant adjacente. Il y a alors création d'un dipôle dans le solvant par le soluté, et création d'une attraction électrostatique entre le soluté et le solvant. Ces interactions de dispersion sont d'autant plus élevées que le solvant et le soluté sont davantage polarisables, et que l'indice de réfraction est élevé. Elles sont mesurées par le paramètre δ_p.

2. Interaction dipôle-dipôle

Si le soluté et le solvant ont des moments dipolaires permanents, des interactions fortes se produisent.
Elles sont quantifiées par le paramètre δ_O.
Par exemple, l'acétonitrile et le nitrométhane

$$CH_3\text{-}\overset{\oplus}{C}\equiv\overset{\ominus}{N} \longleftrightarrow CH_3-N^{\oplus}\begin{matrix}\nearrow \overline{\underline{O}}|^{\ominus} \\ \searrow \overline{\underline{O}}|^{\ominus}\end{matrix}$$

3. Liaisons hydrogène

Elles ont lieu entre les molécules accepteurs de proton (mesuré par δ_a) et les molécules donneurs de protons (mesuré par δ_d). Les donneurs forts sont les alcools, les acides carboxyliques, les phénols, et les accepteurs forts les amines primaires, secondaires, sulfoxydes…

4. Les interactions diélectriques

Les ions polarisent les molécules de solvants de forte constante diélectrique, d'où la création d'interaction électrostatique entre ions et solvant.

C. Polarité d'un solvant selon Snyder

Plus les forces précédentes sont fortes, plus grande est l'affinité des molécules de solvant pour celles du soluté et ces interactions définissent la polarité du solvant qui peut être mesurée par le paramètre P' de Rohrschneider, fondé sur les solubilités dans des phases stationnaires diverses de composés étalons, en équilibre dans une phase gazeuse. Les étalons retenus par Snyder sont le 1,4-dioxanne (d), l'éthanol, caractérisés par leur pouvoir donneur de liaison hydrogène, et le nitrométhane (n), donnant des interactions dipôle-dipôle importantes.
Les coefficients de distribution calculés (K"), corrigés des masses moléculaires du solvant étudié et du volume moléculaire de l'étalon (soluté), ont permis à Snyder de définir la polarité du solvant (P')

$$P' = \log K''_e + \log K''_d + \log K''_n$$

e, d et n représentant respectivement éthanol, dioxanne et nitrométhane. Les valeurs de K" et de P' permettent de définir des spécificités d'interaction par les rapports

$$X_e = \frac{\log K''_e}{P'} \qquad X_d = \frac{\log K''_d}{P'} \qquad X_n = \frac{\log K''_n}{P'}$$

Les valeurs des différents paramètres pour chaque solvant permettront leur classement par groupes (*tab.* 2). Ainsi, les solvants qui montrent une sélectivité voisine sont dans le même groupe, et si le solvant d'un groupe montre une sélectivité insuffisante, il est inutile de recourir à un autre du même groupe (*fig. 1*).
En première approximation, on peut dire que le facteur de capacité d'un soluté varie de 10 chaque fois que P' varie d'un facteur 2.

Tableau 2. Classification des solvants selon Snyder

Solvants	P'	X_e	X_d	X_n	Groupe	N°
Éthanol	4,3	0,52	0,19	0,29	Alcools aliphatiques	II
Dioxane	4,8	0,36	0,24	0,40	Cétones et esters aliphatiques	VIa
Nitrométhane	6,0	0,28	0,31	0,40	Hydrocarbures aromatiques, dérivés nitrés, éthers aromat.	VII
Méthanol	5,1	0,48	0,22	0,31	Alcools aliphatiques	II
n-propanol	4,0	0,54	0,19	0,27	Alcools aliphatiques	II
i-propanol	3,9	0,55	0,19	0,27	Alcools aliphatiques	II
n-butanol	3,9	0,59	0,19	0,25	Alcools aliphatiques	II
t-butanol	4,1	0,56	0,20	0,24	Alcools aliphatiques	II
i-pentanol	3,7	0,56	0,19	0,26	Alcools aliphatiques	II
n-octanol	3,4	0,56	0,18	0,25	Alcools aliphatiques	II
Benzène	2,7	0,23	0,32	0,45	Hydrocarbures aromatiques, dérivés nitrés, éthers aromat.	VII
Toluène	2,4	0,25	0,28	0,47	Hydrocarbures aromatiques, dérivés nitrés, éthers aromat.	VII
Chlorobenzène	2,7	0,23	0,33	0,44	Hydrocarbures aromatiques, dérivés nitrés, éthers aromat.	VII
n-hexane	0,1					
Éther isopropyl	2,4	0,48	0,14	0,38	Éthers aliphatiques	I
Dichlorométhane	3,1	0,29	0,18	0,53	Dichloroéthane Dichlorométhane	V
THF	4	0,38	0,20	0,42	Dérivés pyridiniques, THF, sulfoxides	III
Chloroforme	4,1	0,25	0,41	0,33	Fluoroalcanols, eau	VIII
Acétonitrile	5,8	0,31	0,27	0,42	Sulfones, nitriles	VIB
Eau	10,2	0,37	0,37	0,25	Fluoroalcanols, eau	VIII

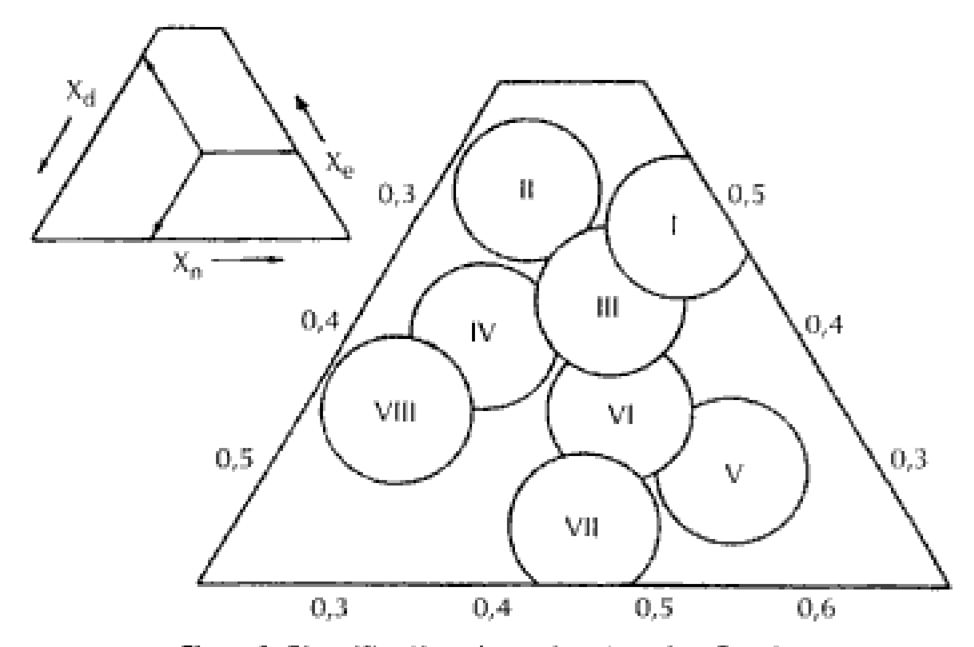


Figure 1. Classification des solvants selon Snyder

Remarque :
La rétention d'un soluté en chromatographie à polarité de phase inversée est d'autant plus grande que sa solubilité dans la phase mobile est faible ; dans le meilleur des cas, la solubilité varie en fonction de la teneur en eau.
Comme la sélectivité pour un couple de solutés croît avec la surface hydrocarbonée greffée, et qu'elle croît avec la polarité de l'éluant, on devrait utiliser des phases stationnaires greffées à longue chaîne et un éluant de forte polarité ; mais on augmente de pair le temps d'analyse, et l'augmentation de la teneur en eau de l'éluant entraîne une augmentation de sa viscosité. Il est donc nécessaire de trouver le meilleur compromis entre la résolution, le temps d'analyse et la viscosité de l'éluant.

C. Influence de la température

Une augmentation de la température provoque en général une diminution du facteur de capacité et de la sélectivité. Pour une série d'homologue, il a été montré que :

$$\log k = a + \frac{b}{T}$$

a et b étant des constantes reliées aux grandeurs thermodynamiques de transfert du soluté, et T la température absolue.

$$\log \alpha = c + \frac{d}{T}$$

c et d étant des constantes.
De plus, l'augmentation de température diminue la viscosité de la phase mobile, et l'efficacité des colonnes augmente. On peut dire qu'on a une influence favorable sur la résolution par augmentation de la température. Celle-ci est cependant limitée par la stabilité du greffage.

VI. Appareillage

La granulométrie de la phase stationnaire définit deux types de chromatographie liquide :

- pour le premier type, les colonnes sont remplies de phase stationnaire dont le diamètre des particules est > 10 µm et la phase mobile les traverse par gravité. Actuellement, il est surtout utilisé pour la purification d'échantillons ;
- pour le second, les colonnes sont préparées avec des particules de phase stationnaire de diamètre compris entre 2 et 10 µm, ce qui augmente l'efficacité et améliore la résolution. C'est ce dernier type de chromatographie qui est le plus utilisé, il s'agit de la chromatographie liquide haute performance (CLHP). L'appareillage comprend différents modules reliés entre eux par des canalisations de faible diamètre interne (0,1 mm) traditionnellement en acier inoxydable ; elles sont depuis peu en PEEK® (*polyether-etherketone*, polyétheréthercétone), polymère souple résistant aux solvants et aux pressions élevées.

Il ne subsiste actuellement presque que les pompes à débit constant ; les pompes pneumatiques, bien que moins coûteuses et à pression constante, ont pratiquement disparu.
La grande majorité d'entre elles sont des pompes à piston alternatif afin d'éviter l'intermittence du débit inhérent au fonctionnement des pompes à simple piston (remplissage expulsion).
La régularité des débits se situe entre 0,01 mL et 10 mL/min, elle est nécessaire pour assurer une bonne reproductibilité des analyses. Les pompes sont équipées de capteurs qui transmettent les informations nécessaires à modifier la course du piston pour maintenir un débit constant.
Les pompes à seringue sont capables de fournir un débit non pulsé. Le déplacement du piston refoule le liquide à vitesse constante. Elles sont souvent mises en œuvre avec des colonnes capillaires et en chromatographie en phase super critique.

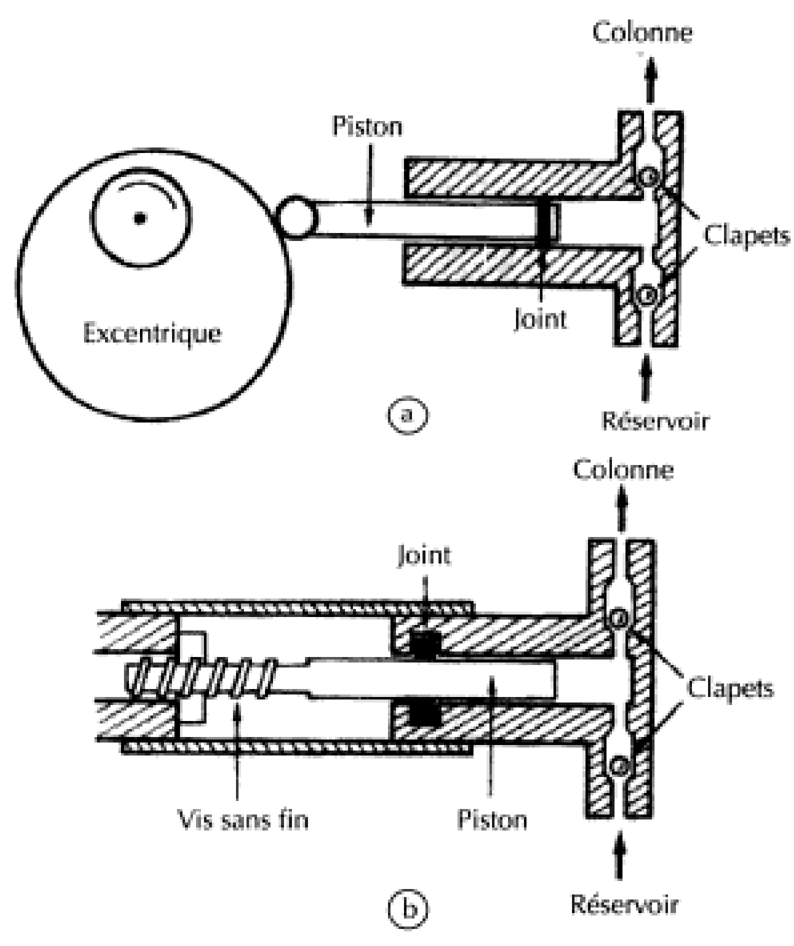


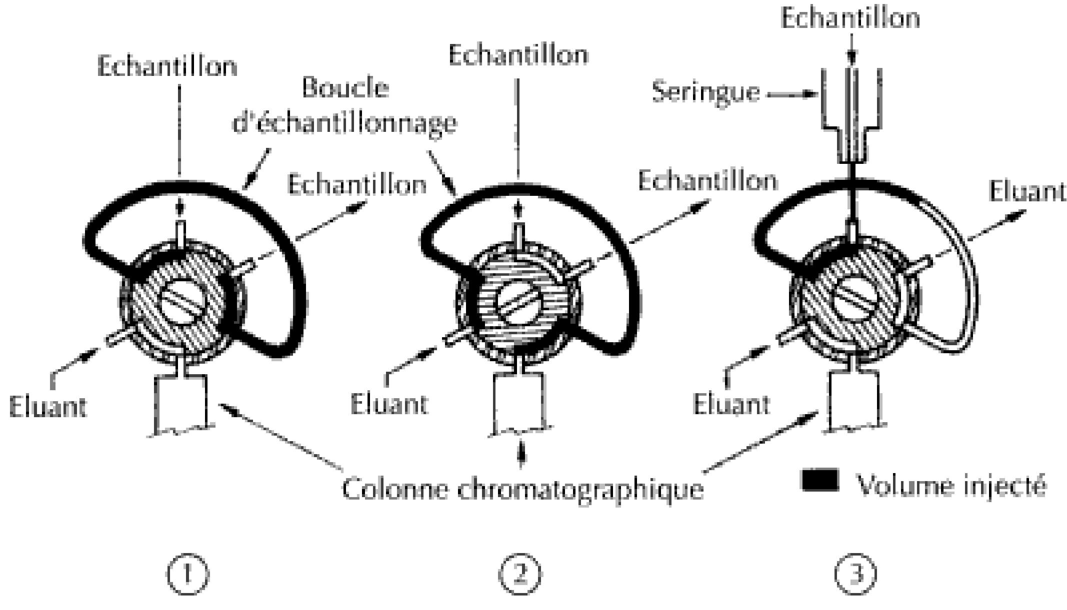
Figure 2. Principe d'une pompe (a) de type piston et (b) de type seringue

Lorsqu'on fonctionne avec une composition fixe d'éluant, on est en mode isocratique et une pompe suffit. Si l'on fait varier la composition de l'éluant au cours d'une analyse, on est alors en gradient d'élution.
Pour obtenir ce dernier, deux systèmes coexistent :
- gradient à basse pression obtenu au moyen d'électrovannes ultrarapides ;
- gradient obtenu par l'intermédiaire de plusieurs pompes pour réguler le débit, on ajoute souvent des amortisseurs de pulsations.

Les têtes de pompes sont biocompatibles et sont fabriquées en titane, en céramique ou en matière synthétique.

C. Les systèmes d'injection

L'injection doit être réalisée dans un temps très bref pour perturber le moins longtemps possible le régime dynamique établi dans le système. Les injections directes de l'échantillon, à travers un septum à l'aide d'une seringue, qui ne sont utilisables que pour de faibles volumes injectés et sous faible pression, sont rarement rencontrées ; on préfère le procédé d'injection à boucle. Il est constitué de vannes à 4, 6 ou 16 voies en matériaux variés biocompatibles (*fig.* 3).
Les passeurs d'échantillons plus fiables et plus perfectionnés sont de plus en plus utilisés, surtout quand les analyses sont répétitives et la chaîne chromatographique automatisée.



1. Remplissage total de la boucle avec l'échantillon
2. Injection du contenu de la boucle sur la colonne
3. Remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon

Figure 3. Vanne d'injection à boucle

D. Systèmes de détection et d'enregistrement

Ils ont pour rôle de suivre en continu la présence des composés dans la phase mobile au fur et à mesure de leur élution. Un détecteur doit permettre une analyse quantitative fiable, pour cela il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- une réponse rapide stable et reproductible ;
- une bonne sensibilité ;
- le bruit de fond doit être le plus faible possible ;
- un domaine de linéarité ;
- un volume mort le plus réduit possible ;
- une limite de détection faible compatible avec les résultats attendus.

Ces systèmes peuvent être *universels*, n'importe quel soluté modifie une propriété de la phase mobile, ou *sélectifs*, ils sont alors basés sur une propriété particulière du soluté.

7. Détection par spectrométrie de masse

Le couplage CLHP-SM en ionisation chimique et en impact électronique permet une étude de structure des solutés séparés (utilisé en recherche). Le nombre des couplages CL-SM ne cesse d'augmenter. Il y a maintenant une gamme importante d'interfaces, allant de l'introduction directe au thermospray, électrospray, et elles deviennent des appareils de paillasse.

Le thermospray présente l'avantage d'être compatible avec la CLHP classique (débit compris entre 1 et 2 mL/min, phase mobile aqueuse adaptée à l'analyse de molécules polaires). En sortie de colonne, la phase mobile qui contient nécessairement un sel volatil, le plus souvent de l'acétate d'ammonium (introduit dans la phase mobile ou post-colonne), est vaporisée dans le capillaire.

La température portée aux alentours de 200 °C est contrôlée et modulée en fonction de la nature de la phase mobile et de son débit. Au cours de son cheminement dans le capillaire, le solvant s'évapore et il forme un « spray » constitué de gouttelettes d'acétate d'ammonium entourées de vapeur dans lesquelles sont inclus les solutés polaires. Ces gouttelettes de sel, chargées, diminuent en taille au fur et à mesure de la désolvatation dans le capillaire. Lorsque le solvant a complètement disparu, un échange de protons est possible entre le sel et le soluté. Le système correspond à une ionisation chimique classique, avec des ions réactifs produits par des mécanismes différents.

8. Autres systèmes de détection

Il existe d'autres détecteurs à usage plus spécifique, ils sont réservés à l'identification et au dosage de molécules particulières. Ils font appel à des mesures :

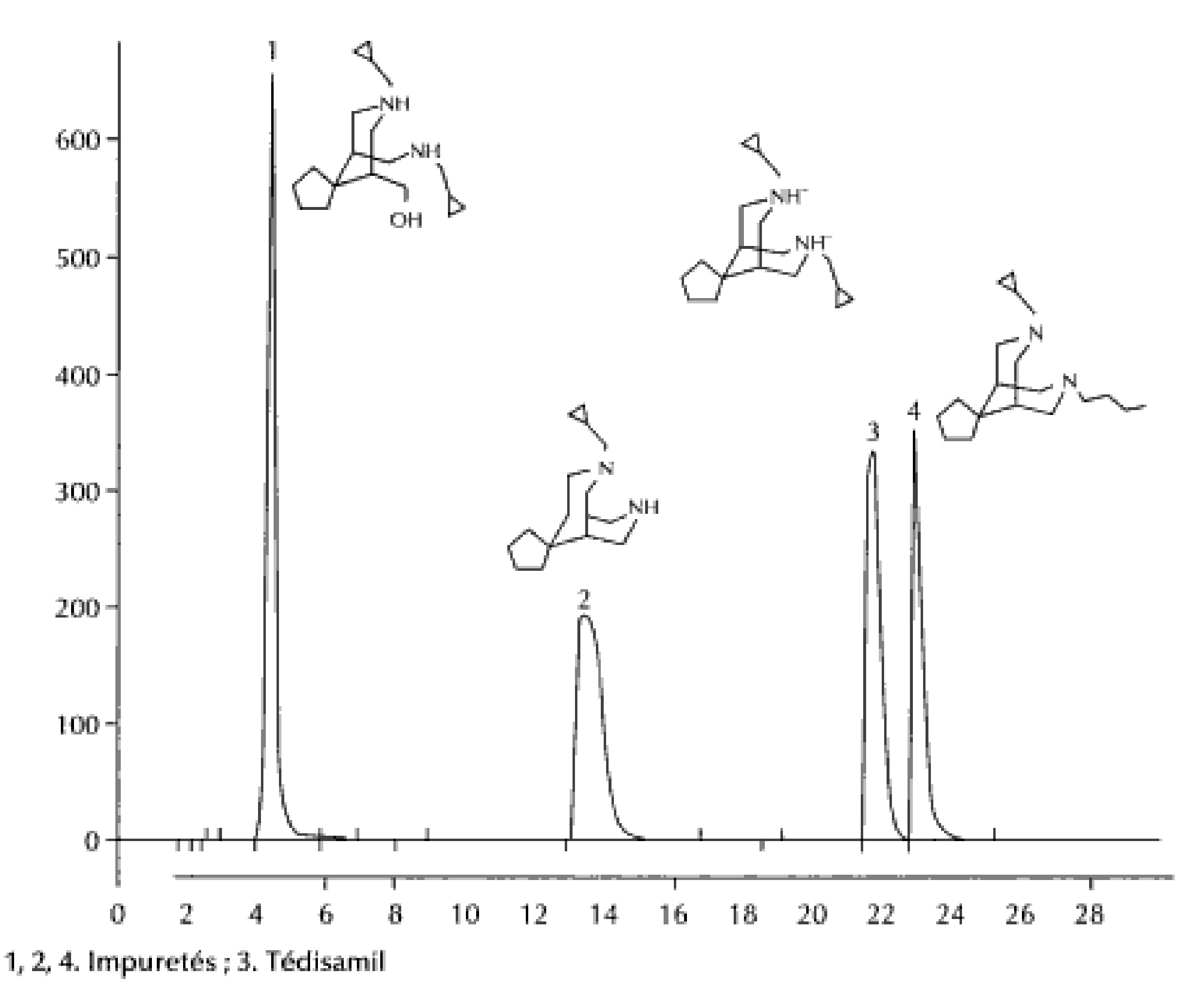
- en spectrométrie infrarouge pour la détection de lipides de dérivés carbonylés ;
- de radioactivité pour des molécules marquées au ^{14}C, ^{3}H... ;
- de polarimétrie ou de dichroïsme circulaire pour des molécules chirales ;
- de chimioluminescence, par exemple : dosage du chlorhydrate de tédisamil et de ses impuretés (chromatogramme).

VII. Applications

La simplicité d'utilisation de la chromatographie liquide de partage, en particulier avec des phases stationnaires greffées alkyles, permet de nombreuses analyses.

En phase normale, elle s'applique aux solutés généralement solubles dans l'eau de polarité moyenne ou très polaire, alors que celle en phase inverse permet de séparer des composés apolaires ou peu polaires.

La chromatographie liquide de partage avec une phase stationnaire greffée inverse peut même être utilisée pour la séparation d'ions organiques après addition à la phase mobile de contre-ions. Il y a alors appariement d'ions, d'où le nom donné à ce type de chromatographie « chromatographie par appariement d'ions ». La méthode est valable pour les cations et les anions. Les réactifs utilisés comme contre-ions « PIC B » sont des anions généralement dérivés d'acides sulfoniques à longues chaînes hydrocarbonées pour l'appariement des cations de bases organiques, et les



1, 2, 4. Impuretés ; 3. Tédisamil

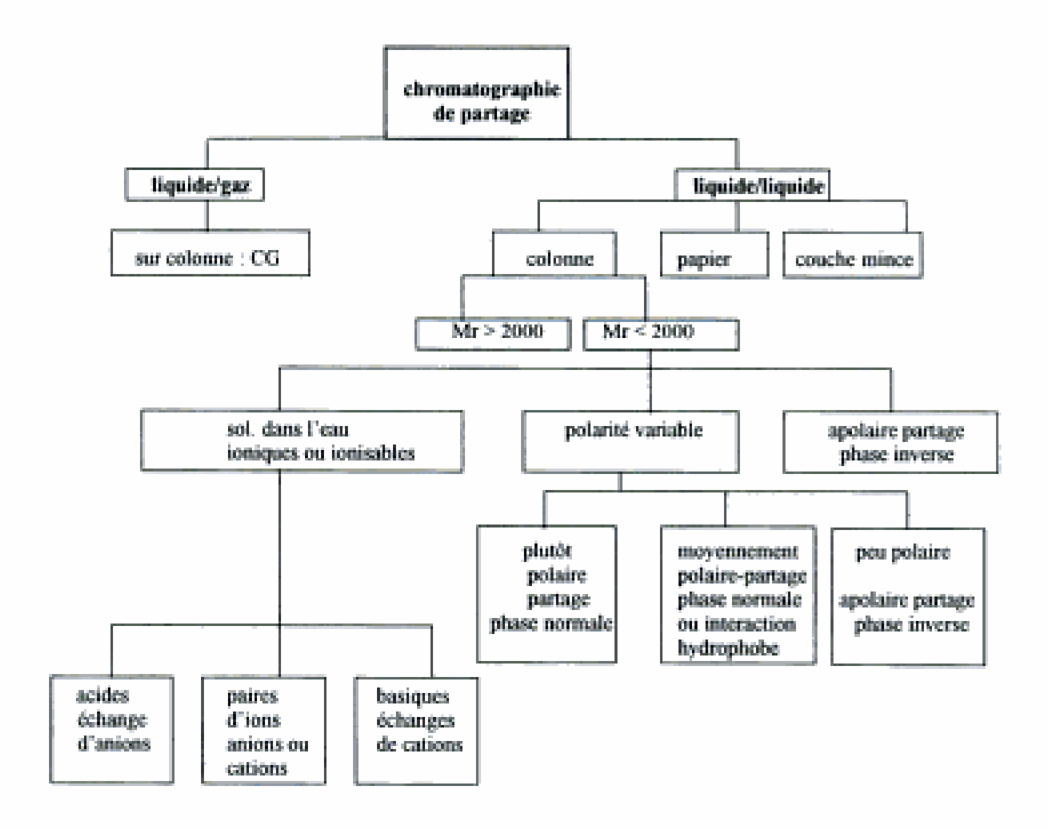
Figure 4. Chromatogramme du dosage du tédisamil et de ses impuretés.

« PIC A », cations généralement dérivés d'ammonium quaternaire pour l'appariement des anions.
La chromatographie liquide est mise en œuvre sur colonne et sur couche mince. Dans ce dernier cas, la phase stationnaire, de même nature que pour les colonnes, est déposée en film de faible épaisseur (entre 0,1 et 2,5 mm) sur une surface rigide (le verre) ou souple, et sa nature est la même que pour les colonnes.
Un nouveau type de phase stationnaire greffée qui utilise des interactions moléculaires $\pi - \pi$ et dipôle-dipôle permet la séparation d'isomère tel que des benzènes disubstitués. L'exemple ci-dessous illustre la séparation du chrysène et benz[α]anthracène par interactions hydrophobes, interactions $\pi - \pi$, interactions par transfert de charge, interactions stéréosélectives ou des combinaisons de ces interactions.
Par exemple : Séparation de 1 = benz[α]anthracène, 2 = chrysène.

Phase stationnaire

$$—O—Si(CH_3)_2—CH_2—CH_2—$$

Dans ce type de chromatographie, le constituant le moins polaire est élué en premier, l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit donc le temps d'élution.
En chromatographie en mode inversé, au contraire, le constituant le plus polaire est élué en premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile augmente le temps d'élution. Le mélange de solutés à séparer oriente le choix de colonne quant à son efficacité et donc à sa longueur, son diamètre et sa granulométrie.
Un schéma d'utilisation est proposé qui permet d'orienter le choix de phases stationnaires.



L'essentiel de la question

La chromatographie de partage liquide-liquide est une méthode d'analyse relativement récente, elle est l'une des plus utilisée.
Son principe est basé sur le partage des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile, toutes deux liquides.
La distribution des solutés entre les deux phases non miscibles est régie par le coefficient de partage $K = C_s/C_m$ avec C_s et C_m qui représentent respectivement la concentration du soluté dans la phase stationnaire et celle dans la phase mobile.
La chromatographie liquide de partage fait intervenir des interactions réversibles entre soluté, phase stationnaire et phase mobile.
La phase stationnaire liquide est immobilisée sur un support, soit par imprégnation, soit par greffage, c'est ce mode qui est le plus utilisé. Le greffage peut-être de nature polaire ou apolaire. Le support est le plus souvent de la silice qui dispose de groupements silanols sur lesquels on greffe la phase stationnaire par réaction chimique. Le nombre de groupements silanols greffés est important, il caractérise la phase stationnaire et il conditionne la symétrie des pics chromatographiques.

La phase mobile utilisée est aqueuse ou organique, ou c'est un mélange. Elle met en jeu différents types d'interactions de nature et d'intensité variables selon le solvant. Ils peuvent être caractérisés par différentes grandeurs telles que le paramètre de solubilité d'Hildebrand δ ou la polarité selon Snyder P'. Il est alors possible de comparer les propriétés selon la valeur de ces paramètres.
Si la phase stationnaire greffée est de nature polaire, la phase mobile sera apolaire ou peu polaire, on parle de chromatographie classique ; si la phase stationnaire greffée est de nature apolaire ou peu polaire, la phase mobile sera polaire et l'on parle alors de chromatographie en phase inversée.
Le facteur de capacité ou de rétention des solutés k est relié au coefficient de partage et au rapport du volume de phase stationnaire à celui de la phase mobile. Ceux-ci jouent donc un rôle important sur la rétention des solutés, k varie avec la température.
L'appareillage comprend un réservoir de solvant qui fournit la phase mobile, un système de pompage qui pousse la phase mobile à travers le système chromatographique avec un débit constant, un injecteur qui permet l'introduction de l'échantillon, la colonne qui sépare les différents constituants du mélange analysé, un détecteur qui donne un signal pour chaque composé séparé et un système soit informatique, soit un intégrateur, qui traduit le signal reçu du détecteur et qui donne le chromatogramme.
Les détecteurs sont très variés, ils sont choisis selon les propriétés des solutés à séparer et selon leur concentration dans l'échantillon de départ.
Les applications de la chromatographie de partage sont très nombreuses en raison de sa simplicité d'utilisation et l'étendue du domaine d'application : composé polaire, apolaire, ionisé de nature organique ou minérale. Elles concernent des produits à usage thérapeutique, alimentaires, des pesticides, des toxiques, des stupéfiants, des additifs… dans des milieux variés.
Son grand intérêt est d'associer en une seule analyse les possibilités de séparation, d'identification et de quantification des constituants d'un mélange.
Le choix de la méthode est essentiellement conditionné par la nature chimique des composés à séparer.
En règle générale, on adopte la polarité de la phase stationnaire à celle de l'analyte et l'on choisit une phase mobile dont la polarité est très différente.

Pour en savoir plus

- John W. Dolan *LC-GC* 1999 ; 12 (3), 156.
- Andreas Körner *LC-GC* 1999 ; 12 (5), 287.
- Ronald E. Majors *LC-GC* 1999 ; 12 (6), 344.
- Mahuzier G., Hamon M., Ferrier D., Prognon D. *Chimie analytique. Méthodes de séparation*, t. II, 3e éd., Paris, Masson, 2002.
- Mahuzier G., Hamon M. *Abrégé de chimie analytique*, 2e éd., t. II, Paris, Masson.
- Pradeau D. *Analyse pratique du médicament*. Éditions médicales internationales, Cachan, 1992.
- Rosset R., Caude M., Jardy A. *Manuel pratique de la chromatographie en phase liquide*. 2e éd., Paris, Masson, 1991.
- Rouessac F., Rouessac A. *Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes*, 2e éd., Paris, Masson, 1994.

Chromatographie en phase gazeuse

H. BARGNOUX, S. GUENU, C. LARTIGUE
Laboratoire de chimie analytique et spectrométrie de masse, UFR de pharmacie, Clermont-Ferrand.

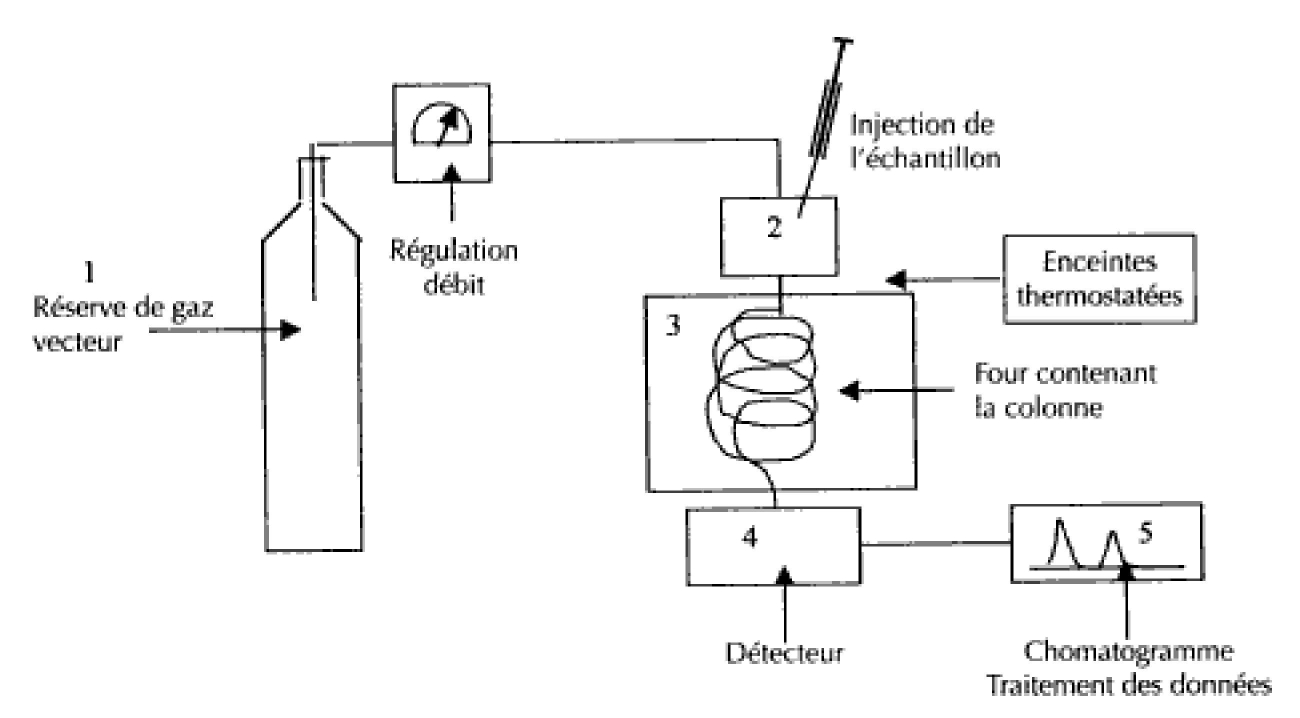


Figure 1. Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

pour laquelle l'hydrogène constitue le meilleur choix et à la mise sur le marché de générateurs d'hydrogène, systèmes permettant d'éviter le stockage et la manutention de bouteilles sous pression. Pour un gaz vecteur donné, il existe une valeur optimale de débit selon la colonne utilisée (équation de van Deemter) et ce paramètre doit être optimisé.

Un des paramètres essentiels de la reproductibilité de la séparation chromatographique est la régulation du débit du gaz vecteur. Celle-ci est assurée, au niveau du chromatographe, par un *contrôle électronique* qui garantit la stabilité des débits mais permet également la réalisation d'une programmation de la pression en gaz vecteur, améliorant ainsi notablement le temps d'analyse.

B. Système d'injection

Le système dépend de la nature de l'échantillon (mélange gazeux ou solution volatile) et du type de colonne (remplie ou capillaire).

Le *mode d'injection le plus classique*, utilisé pour les *colonnes remplies*, consiste à injecter directement l'échantillon à l'aide d'une microseringue (1 à 10 µL) à travers un septum (pastille d'élastomère).

Dans le cas des *colonnes capillaires*, il existe quatre systèmes d'injection :

- *injecteur diviseur* (*Split*) : le gaz vecteur est divisé en deux flux, dont l'un pénètre seul dans la colonne, l'autre s'échappant par un système de fuite, selon un rapport réglable à volonté et qui doit être optimisé ;
- *injecteur sans diviseur* (*Splitless*) : réservé aux solutions très diluées, la solution injectée est volatilisée à chaud puis recondensée en tête de colonne à basse température. Après élimination du solvant par balayage de l'injecteur, les substances sont volatilisées par élévation progressive de la température ;
- *injecteur à aiguille* (*injecteur de Ross*) : après dépôt à froid de la solution à l'extrémité d'une aiguille de verre et évaporation du solvant par un contre-courant

1. Phases stationnaires

Elles sont au cœur de la séparation chromatographique.

a) Phases stationnaires solides

Les phases stationnaires solides, de nos jours peu utilisées, sont constituées de petites particules de granulométrie très homogène (exprimée en mesh). Elles comprennent :
- *les tamis moléculaires* (cristaux d'aluminosilicates) qui retiennent les molécules en fonction de leurs dimensions dans leurs micropores, lesquelles sont ensuite exclues lors d'une élévation de température ;
- *des polymères poreux* type Porapak (polymérisation de vinyl-éthylbenzène en présence de divinyl-benzène) qui conviennent pour la séparation de composés polaires à points d'ébullition élevés tels que les alcools ou amines.

b) Phases stationnaires liquides

Les phases stationnaires liquides, les plus largement utilisées, sont soit :
- dans le cas des colonnes remplies, *imprégnées sur un support solide*, le plus souvent à base de silice (Chromosorb), de grande stabilité thermique et inerte (lavage aux acides et désactivation des groupements silanols [Si-OH] par silanisation) ;
- dans le cas des colonnes capillaires, *déposées ou greffées sous forme de film*.

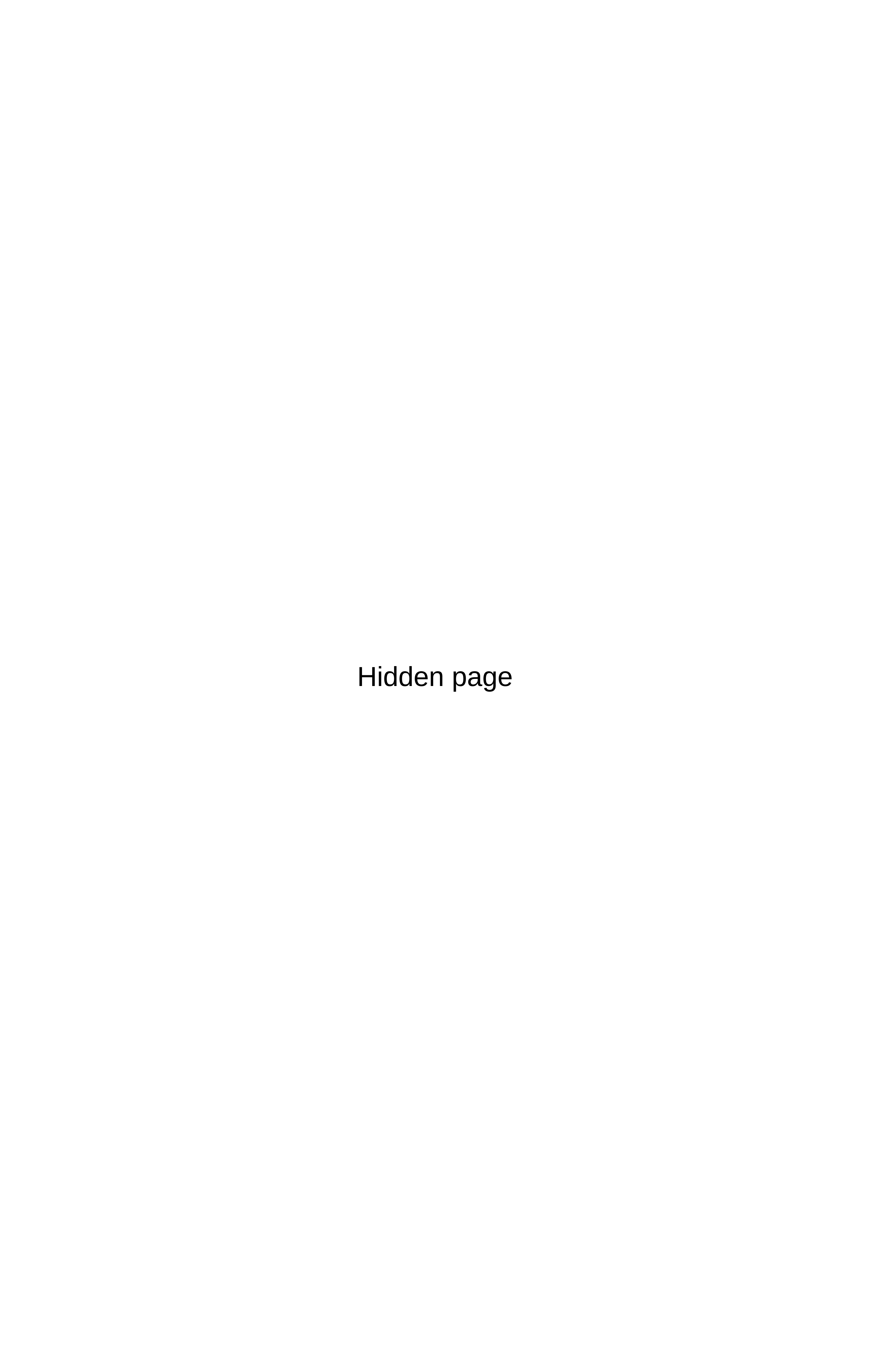
Les phases stationnaires liquides ont une viscosité élevée. Elles se caractérisent par leur structure chimique, leur polarité, leur aptitude à dissoudre les molécules (interactions variées) et leur température maximale d'utilisation, température au-delà de laquelle elles risquent d'être détruites ou éluées par le gaz vecteur.

Elles peuvent être réparties en deux grands groupes :
- polyéthers de glycols (ex. : Carbowax-Ucon), phase polaire ;
- silicones (polysiloxanes, ex. : OV, SP, DB), phase de polarité variable.

Les phases polysiloxanes sont les plus largement utilisées. Elles peuvent être greffées par des radicaux plus ou moins polaires (méthyl, phényl, cyanopropyl, trifluoropropyl…), sous forme de combinaisons variées (*tab. 1*) leur conférant des sélectivités plus ou moins grandes, selon le nombre et le type d'interactions susceptibles d'être mises en jeu.

2. Four

Destiné à recevoir les colonnes, le four doit posséder une excellente stabilité thermique. L'homogénéité de la température est assurée par un système de ventilation, sous le contrôle d'un programmateur de température, « monitorant » les températures initiales et finales, les durées de chaque palier, ainsi que les taux de programmation (°C/min) qui peuvent varier de 0,1 à 120 °C/min sur certains appareils. L'analyse chromatographique peut se dérouler, soit en mode isotherme (température constante en cours d'analyse), soit en programmation de température. Dans ce dernier cas, un retour particulièrement rapide à la température initiale est un critère important de performance du système.



Hidden page

faible quantité d'un composé qui induit un signal égal à 3 fois celui du bruit de fond), sa gamme de linéarité (proportionnalité réponse/concentration), son temps de réponse.

1. Détecteurs classiques

Pour la plupart destructifs, ils sont habituellement classés en détecteurs *non spécifiques*, capables de déceler une très grande variété de molécules, et en *détecteurs spécifiques*, présentant une plus grande sensibilité vis-à-vis d'atomes ou de groupements fonctionnels déterminés.

a) Détection par conductibilité thermique

Premier détecteur à avoir été utilisé, le catharomètre est le plus universel et le plus simple des détecteurs (*fig.* 2).
Le principe repose sur la diminution de la conductibilité thermique du gaz vecteur en présence de molécules étrangères présentes dans l'éluat gazeux. Cela se traduit par un déséquilibre du pont de Wheastone placé à la sortie des deux effluents gazeux (référence et mesure) et création d'une différence de potentiel, qui est ensuite amplifiée et enregistrée. Seuls l'hélium et l'hydrogène peuvent être utilisés en raison de leur forte conductibilité thermique. Le catharomètre est non destructif et non spécifique (molécules organiques, gaz, eau). Sa limite de détection est moyenne, de l'ordre du μg *injecté*. Son utilisation tend à disparaître.

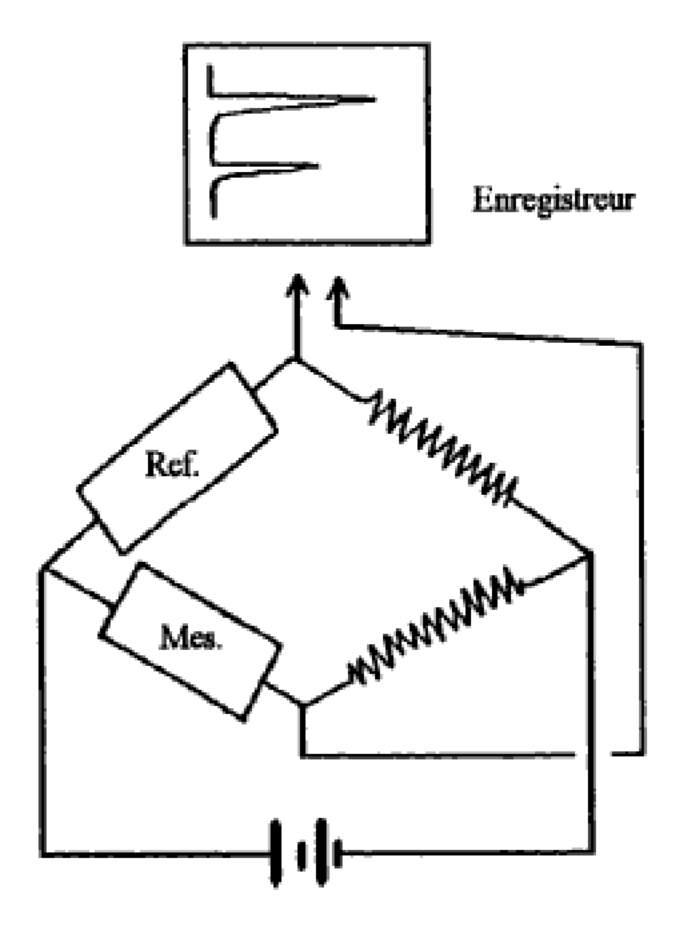


Figure 2. Schéma d'un catharomètre

b) Détection par ionisation de flamme (FID : *flame ionization detector*)

Elle consiste à brûler les molécules dans une flamme d'hydrogène (en présence d'air) placée entre deux électrodes polarisées. La température de la flamme (# 2 100 °C) est suffisante pour brûler la plupart des composés organiques. Les ions formés sont alors collectés par une électrode. Le courant d'ions créé, proportionnel au nombre de molécules, est alors transmis après amplification.
Ce détecteur, de type destructif, est non spécifique (tous les composés organiques) et sa sensibilité varie de 10^{-6} à 10^{-9}g (*fig.* 3).

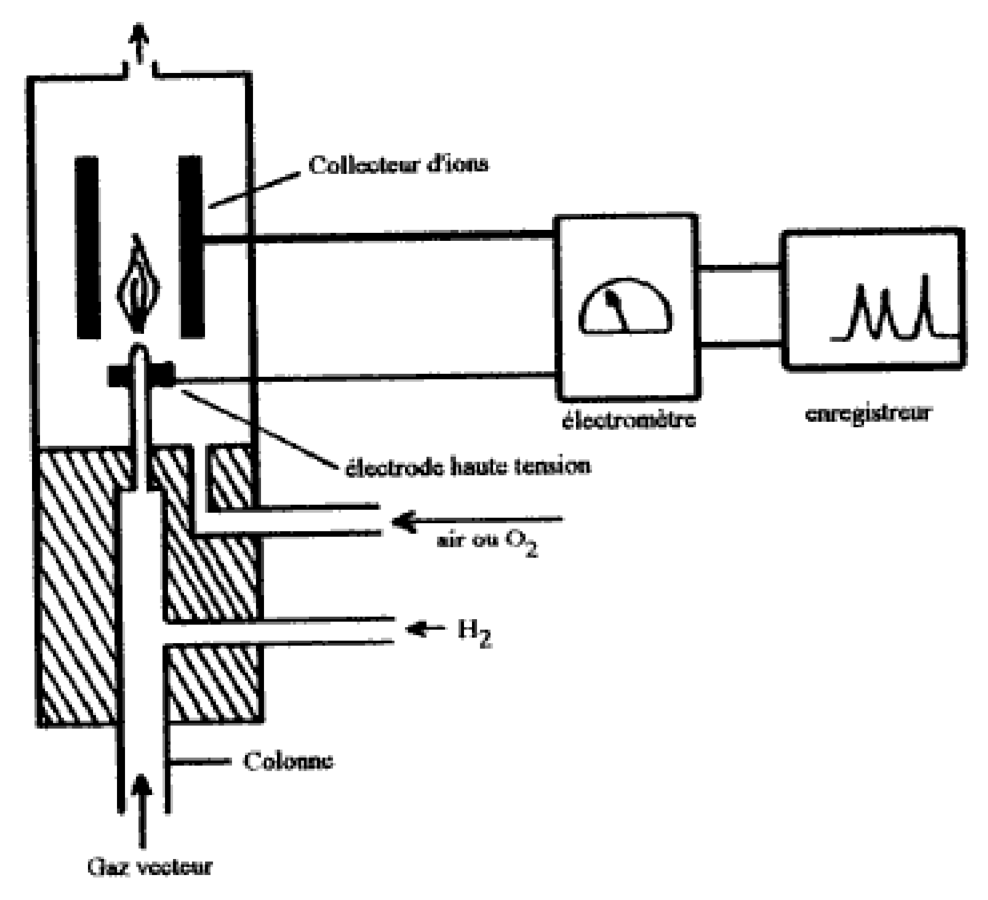


Figure 3. Schéma d'un détecteur par ionisation de flamme

c) Détection par thermo-ionisation (NPD : *nitrogen-phosphorous detector*)

De même principe que le précédent, il comporte en outre une céramique contenant un sel de métal alcalin (césium ou rubidium) qui augmente sélectivement la réponse du détecteur (environ *100 fois*) vis-à-vis des composés phosphorés (sel de césium) ou azotés (sel de rubidium). Les composés azotés, pyrolysés dans la flamme, donneraient des radicaux libres qui seraient alors susceptibles de capter un électron (provenant d'un atome de rubidium excité), ce qui conduirait à la formation d'un ion cyané CN^- alors que les composés phosphorés produiraient un ion phosphite PO_2^-. Cependant, les raisons du gain de sensibilité lié à ce mécanisme d'ionisation restent mal connues.
Ce détecteur est très largement utilisé pour l'analyse des médicaments azotés (barbituriques, hydantoïnes, antidépresseurs…) ou des pesticides organophosphorés.

d) Détection par photométrie de flamme (FPD : *flame photometric detector*)

Comme en ionisation de flamme, l'éluat gazeux est brûlé dans une flamme, mais dans le cas du FPD, la flamme est très réductrice (riche en H_2) afin d'éviter la formation d'oxydes. Ce détecteur (*fig. 4*) répond spécifiquement aux dérivés phosphorés et soufrés.

Ce ne sont pas les ions formés qui sont recueillis, mais les radiations émises (par chimiluminescence) par les molécules excitées de S_2 (à 394 nm) et de HPO (à 526 nm) formées. Sa limite de détection peut atteindre 10^{-9} *à* 10^{-12} g, elle est cependant meilleure pour les composés phosphorés que pour les composés soufrés.

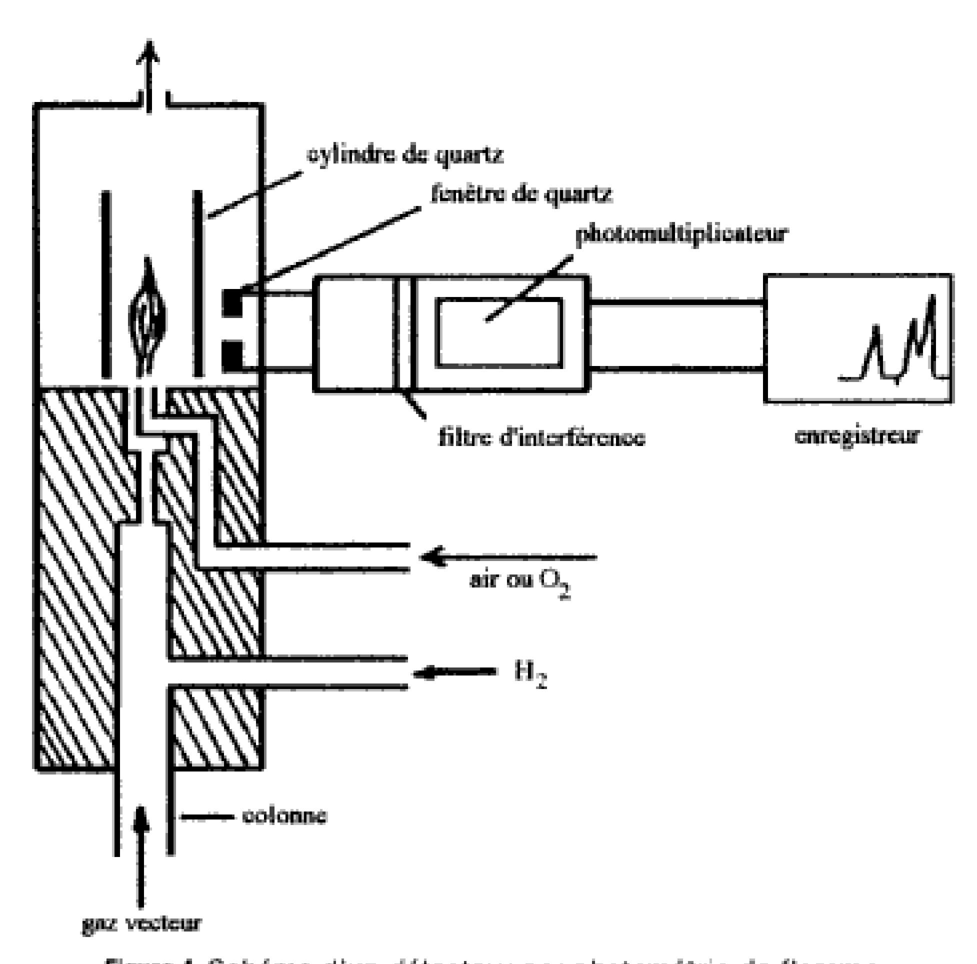


Figure 4. Schéma d'un détecteur par photométrie de flamme

e) Détection par capture d'électrons (ECD : *electron capture detector*)

Elle est fondée sur la capacité de certaines molécules à capter les électrons émis par une source radioactive (tritium ou ^{63}Ni) et de former ainsi des ions négatifs ($M + e^- \rightarrow M^-$), susceptibles de se combiner avec les ions positifs du gaz vecteur (*fig. 5*). Ceci se traduit par une diminution du courant de base. Sa limite de détection est variable (10^{-9} *à* 10^{-12} *g*) selon l'affinité des molécules pour les électrons (halogènes > systèmes conjugués > groupements nitrés). Cependant, sa gamme de linéarité est faible. Ce détecteur est particulièrement intéressant pour le dosage des médicaments susceptibles de former des dérivés fluoroacétylés et pour le dosage des pesticides organochlorés.

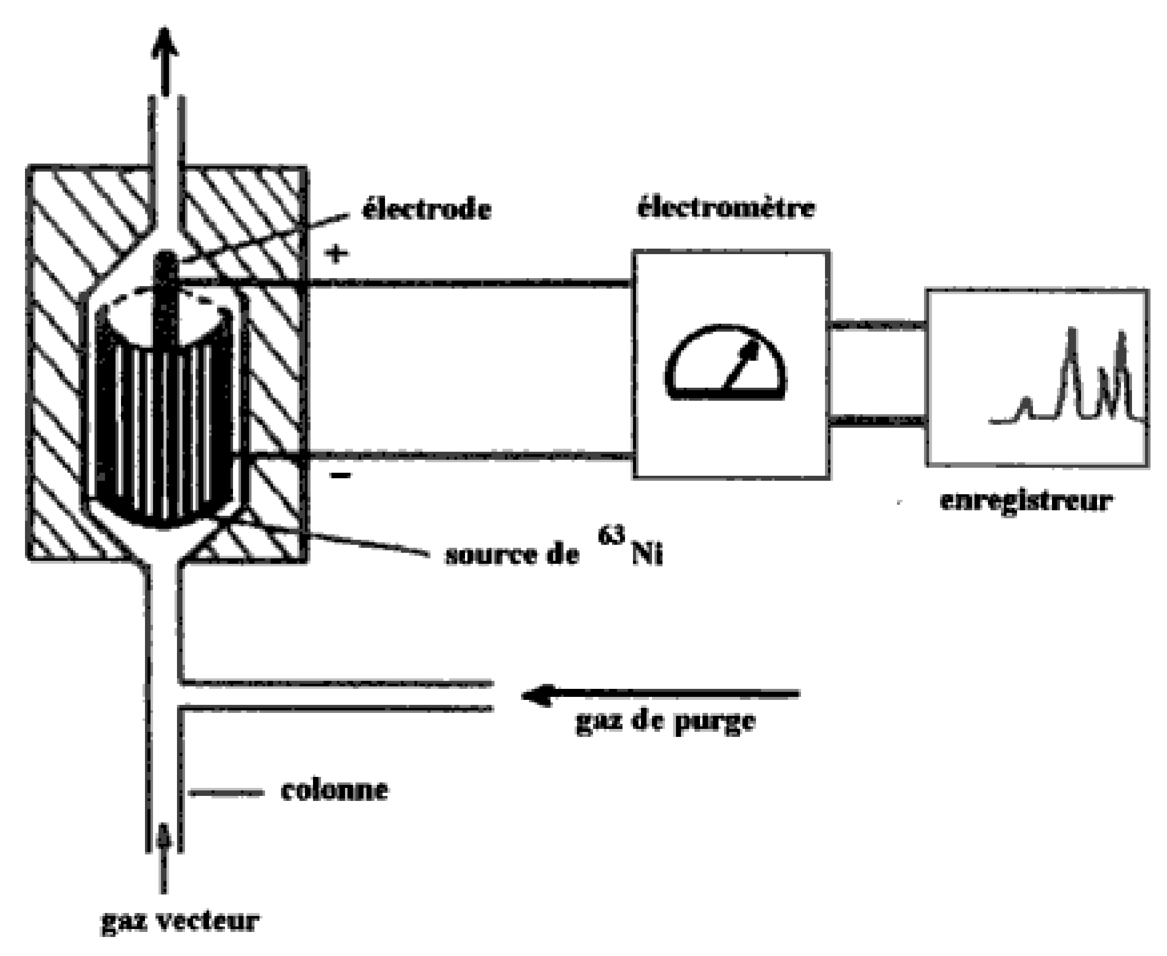


Figure 5. Schéma d'un détecteur à capture d'électrons

f) Détection par spectrométrie de masse (SM)

Le développement des colonnes capillaires en silice fondue, en permettant le couplage direct (sans restricteur de pression) de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse, a conduit au succès du couplage CPG-SM, en particulier depuis la mise sur le marché d'appareils compacts (dits intégrés).

Les techniques d'ionisation en spectrométrie de masse sont nombreuses mais la technique d'ionisation de choix pour le couplage CPG-SM reste l'*impact électronique* (EI : *electron impact*).

Le principe consiste à provoquer l'ionisation d'une molécule, dans une enceinte (*source*) (*fig. 6*) où est maintenu un vide poussé inférieur à 10^{-6} torr, par bombardement à l'aide d'un faisceau d'électrons émis par un filament de tungstène ou de rhénium dans lequel passe un courant (100 à 300 µA) et dont l'énergie peut être choisie entre 10 et 300 eV (la valeur référence pour les bibliothèques de spectres est de 70 eV, cette valeur assure une reproductibilité optimale des spectres de masse). L'excès d'énergie interne qui en résulte induit une dissociation de la molécule ionisée (ionisation primaire) en fragments ionisés (fragmentation secondaire).

Cette source d'ionisation est souvent associée à une source d'ionisation plus douce, l'*ionisation chimique* (CI : *chemical ionization*). Les ions sont alors formés par des réactions de transfert de protons ou de transfert de charges, selon la nature du gaz réactant utilisé (*méthane*, isobutane, ammoniac, etc.). Ces réactions se produisent en phase gazeuse entre les ions, générés à partir du gaz réactant à une pres-

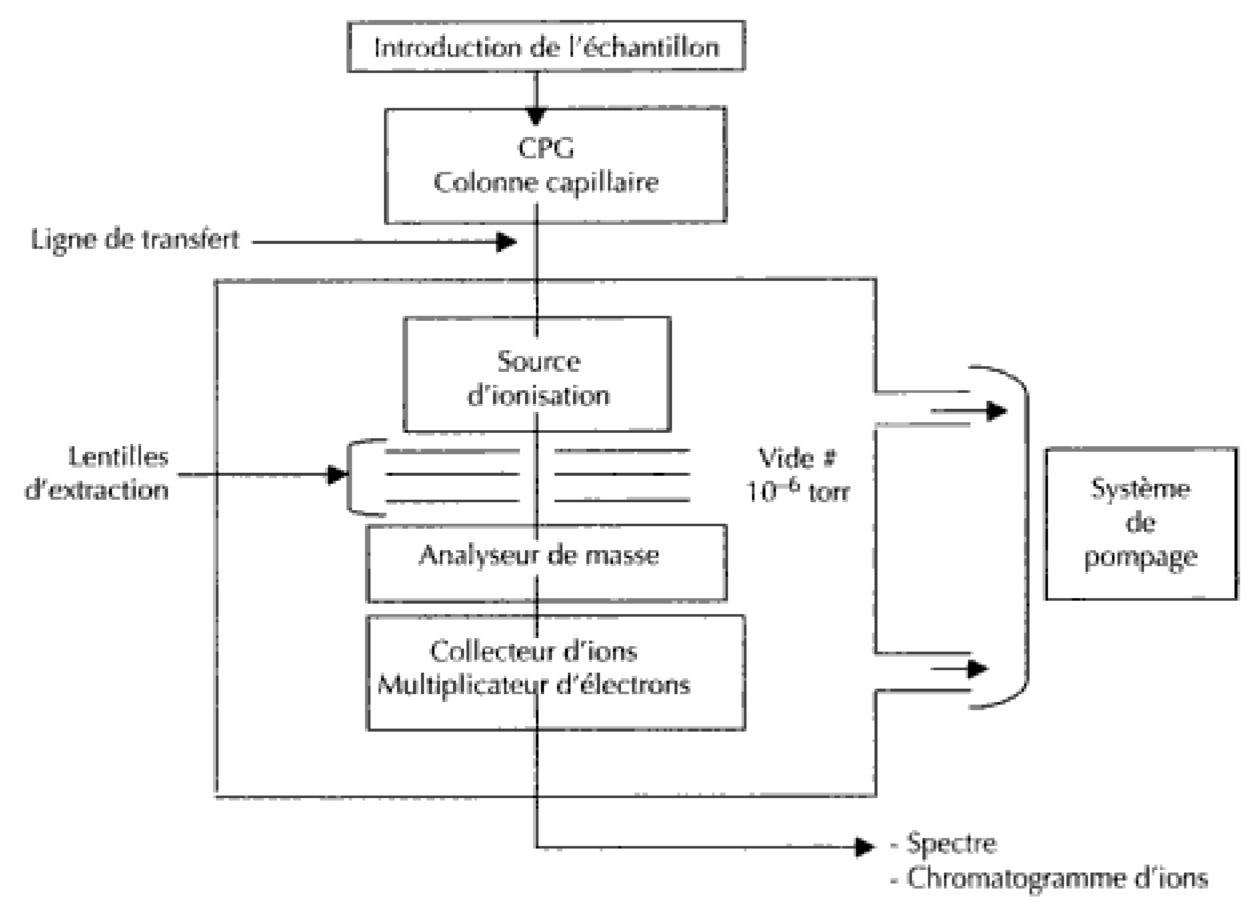


Figure 6. Schéma d'un système de couplage CPG-SM

sion voisine de 1 torr et les molécules non chargées à analyser. L'ionisation s'effectue en deux étapes :

- au cours de la première, un plasma d'ions est produit par bombardement des molécules de gaz réactant par des électrons de haute énergie (200 eV). Lorsque le *méthane* est utilisé comme *gaz réactant*, les principaux ions réactifs formés sont CH_5^+, $C_2H_5^+$, $C_3H_5^+$;
- dans une deuxième étape, ces ions réagissent avec les molécules non chargées de l'échantillon. Avec le méthane, la principale réaction observée est généralement un transfert de proton qui donne naissance à la molécule protonée $(M + H)^+$, pic de base du spectre. Celui-ci est accompagné des ions $(M + C_2H_5)^+$ et $(M + C_3H_5)^+$ et d'un nombre restreint d'ions fragments.

Les ions produits (mode EI ou CI), généralement positifs (à noter qu'il existe un mode d'ionisation chimique en ions négatifs), sont ensuite triés dans un *analyseur de masse* (*fig. 6*) au moyen de combinaisons variées de champs magnétiques ou électriques, selon le rapport m/z de leur masse à leur charge. L'analyseur généralement utilisé pour les couplages CPG-SM est le quadrupole.

L'abondance de chaque ion est ensuite mesurée, à l'aide d'un *collecteur* (multiplicateur d'électrons), puis enregistrée. On obtient ainsi un spectre de masse constitué d'ions, repérés par leur rapport m/z, auxquels on associe leur abondance. Les spectres sont normalisés, en rapportant l'abondance de chaque ion à celle de l'ion le plus important (pic de base). Dans des conditions constantes de fonctionnement du SM, le spectre de masse est caractéristique du composé étudié et permet son identification et l'étude de sa structure.

E. Système d'enregistrement

Les détecteurs identifient le passage d'une substance en générant un *signal électrique* d'intensité plus ou moins grande. Ce signal est alors soumis à un *traitement numérique* (ordinateur) qui génère un chromatogramme et/ou un rapport.
Les systèmes commercialisés sont à fonctions multiples :
- ils commandent le système chromatographique (passeur d'échantillons, programmation de température, détection) ;
- ils suivent le déroulement de l'analyse ;
- ils traitent les données.

II. Optimisation de l'analyse chromatographique

Actuellement, la technologie de la chromatographie en phase gazeuse offre un éventail très large, tant sur le plan de la séparation que sur le plan de la détection ; c'est donc à l'utilisateur de choisir les modalités chromatographiques optimales en fonction de l'analyse à effectuer et des besoins requis en termes de sensibilité et de spécificité.

A. Préparation de l'échantillon

La chromatographie en phase gazeuse s'adresse en priorité aux substances volatiles ; cependant, dans le cas de certains composés difficilement analysables par chromatographie en phase gazeuse par injection directe, il est possible de recourir à une méthode de « dérivation » de l'échantillon aboutissant à la formation de dérivés plus aisément chromatographiables.
Cette méthode s'adresse notamment aux :
- composés à point d'ébullition trop élevé,
- composés thermolabiles ou thermodégradables,
- composés ayant un poids moléculaire trop faible,
- composés présentant une forte polarité (pics chromatographiques larges, non symétriques),
- composés non détectables de façon sensible ou spécifique.

Il faut noter qu'avec le développement des systèmes intégrés CPG-SM, l'emploi des réactions de dérivation s'est avéré particulièrement intéressant en termes de spécificité et de sensibilité. Les réactions de dérivation permettent la formation de dérivés plus lourds, donc plus spécifiques et présentant en outre, des fragmentations caractéristiques améliorant encore la détection en spectrométrie de masse, et ce d'autant que sont apparus sur le marché des réactifs marqués au deutérium.
Les réactions chimiques les plus couramment mises en œuvre sont de trois types.

1. Silylation

Substitution d'un hydrogène mobile (R–OH, Ar–OH, R–COOH, R–NH_2) par un groupement triméthylsilyle [TMS ; $(CH_3)_3$Si–] ou plus récemment, terbutyldiméthylsilyl [TBDMS ; $(CH_3)_3$C–Si$(CH_3)_2$–] particulièrement intéressant en CPG-SM ; cette substitution entraîne une diminution de la polarité par suppression des liaisons hydrogène. Les produits formés sont plus volatils et plus stables.
Les réactifs les plus utilisés sont :

- l'hexaméthyldisilazane (HMDS) : $(CH_3)_3$Si–NH–Si$(CH_3)_3$;
- le triméthylchlorosilane (TMCS) : $(CH_3)_3$Si–Cl, généralement utilisé comme catalyseur en association avec les autres réactifs silylants ;
- le N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) :

$$(CH_3)_3-Si-N=\overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{C}-O-Si-(CH_3)_3$$

- le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) : très réactif et plus volatil que le BSA

$$(CH_3)_3-Si-N=\overset{\overset{\displaystyle CF_3}{|}}{C}-O-Si-(CH_3)_3$$

- le N-méthyl-N-(t-butyldiméthylsilyl)trifluoroacétamide (MTBSTFA) : dernier-né de la série, particulièrement réactif et qui existe sous forme hexadeutérée.

$$O=\overset{\overset{\displaystyle CF_3}{|}}{C}-\underset{\underset{\displaystyle CH_3}{/}}{N}-\overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{\underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{Si}}-C(CH_3)_3$$

Les modalités à observer pour que la réaction soit quantitative (taux de transformation connu et reproductible), peuvent se résumer ainsi :

- milieu strictement anhydre,
- solvant aprotique choisi en fonction de la solubilité de l'échantillon (DMF, THF, pyridine),
- temps de réaction variable selon les composés (quelques minutes à plusieurs heures),
- température de réaction variable également (température ambiante → ébullition),
- large excès de réactif.

L'inconvénient de ce type de dérivation réside dans le risque de réactions incomplètes, particulièrement lorsqu'il existe plusieurs fonctions dérivables, conduisant alors à un mélange de dérivés mono-TMS, di-TMS, tri-TMS... inexploitable en analyse quantitative.

c) Précolonnes

L'analyse de traces est parfois perturbée par la présence de composés annexes en quantités relativement importantes. Il peut alors s'avérer utile et suffisant de procéder à l'adjonction d'une précolonne, chargée d'éliminer les solutés gênants par adsorption irréversible (ex. : tamis moléculaire, ascarite pour adsorption de H_2O, Reoplex 400 pour les acides gras ou dans le cas des colonnes capillaires, adjonction de 1 m de colonne capillaire en silice fondue désactivée retenant les composés non volatils).

d) Cas particulier : « séparation des stéréo-isomères »

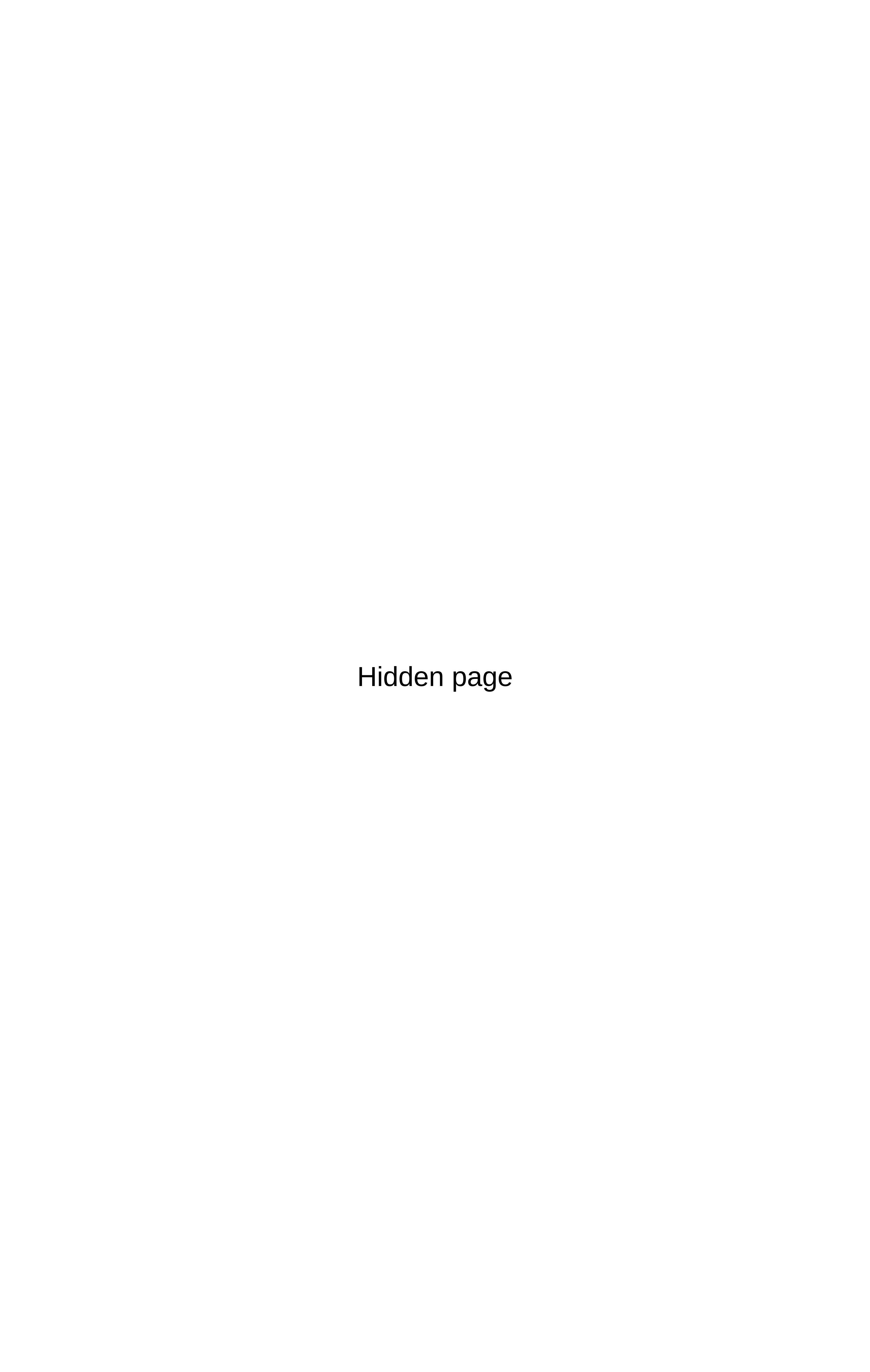
La séparation des diastéréo-isomères est relativement aisée sur les phases stationnaires conventionnelles ; par contre la séparation d'*énantiomères* (isomères optiques) n'a été rendue possible que par le développement de phases dites « chirales ». Elles sont obtenues par greffage de composés optiquement actifs sur les chaînes latérales de polymères de type silicones (RSL 007) ou polysiloxanes (ex. : Chirasil-Val®). Les phases à base de greffons cyclodextrines (α, β, γ), simples ou modifiées sont actuellement les plus utilisées, elles ont conduit à la notion de véritable « cavité chirale », et les mécanismes de séparation, multiples, mettent alors en jeu à la fois les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène, les interactions polaires et les interactions stériques, ce qui explique leur haute sélectivité.

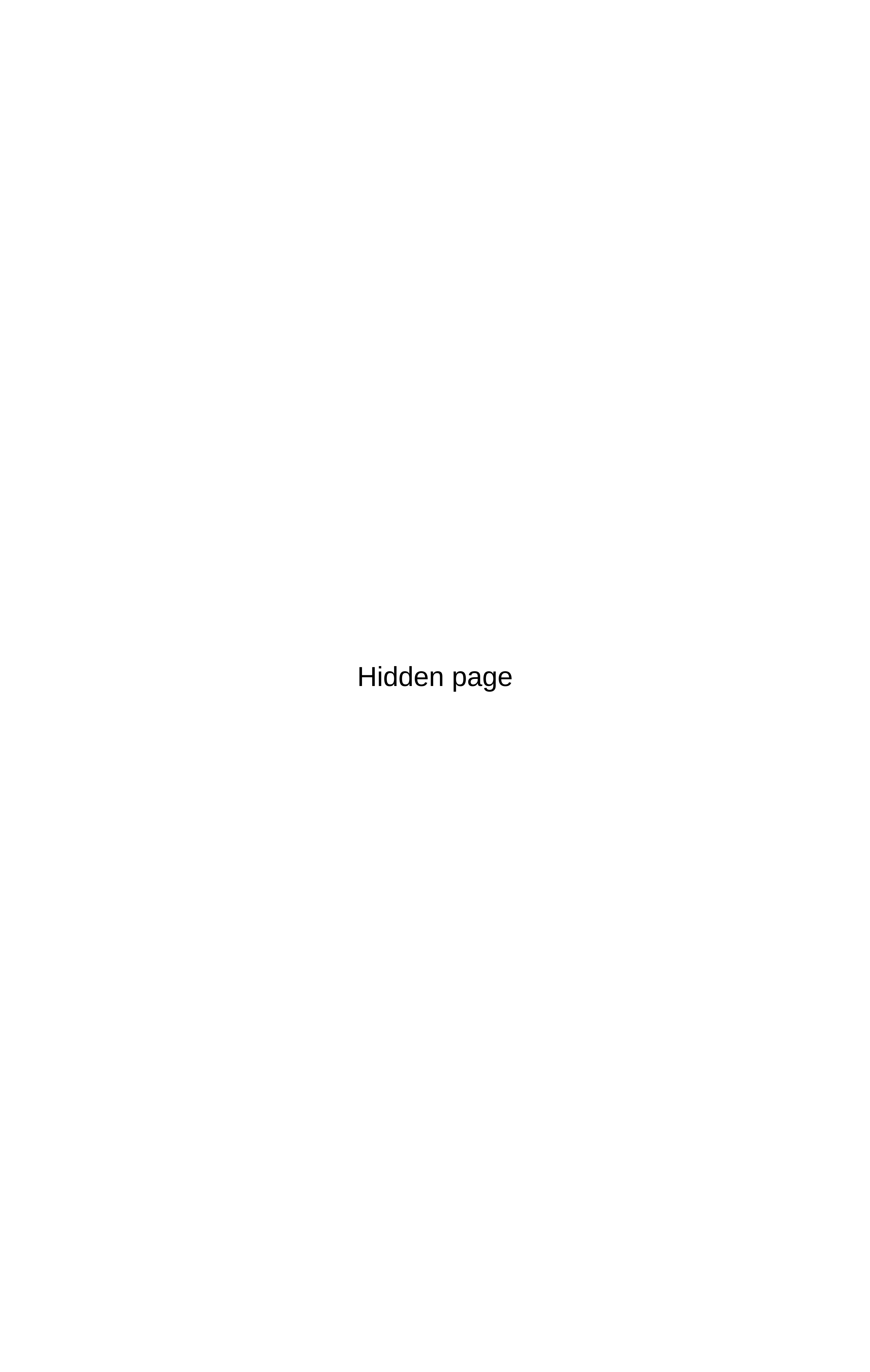
e) Vieillissement des colonnes

Les colonnes de chromatographie vieillissent plus ou moins rapidement selon la température d'utilisation, le nombre d'injections ou la nature « polluante » de l'échantillon. Il peut s'avérer nécessaire périodiquement de « reconditionner » la colonne à température suffisante pour chasser les impuretés, de silaniser le support (dans le cas des colonnes remplies) de façon à bloquer les sites actifs ou encore d'éliminer la section de phase encrassée en tête de colonne, ce qui montre là encore l'intérêt de l'emploi de pré-colonnes.

2. Température

Toute élévation de température entraîne une augmentation de la concentration dans la phase gazeuse, donc une diminution du coefficient de partage ($K = Cs/Cm$) et inversement. Pratiquement, une augmentation de 20 °C diminue les temps de rétention de moitié. De même, la largeur des pics se trouve modifiée, étant directement proportionnelle au volume de rétention Vr, selon $\omega = 4\,Vr/\sqrt{N}$ (N étant le nombre de plateaux théoriques et ω la largeur à la base du pic).
Pour un composé donné, la température peut être choisie après détermination expérimentale de l'efficacité optimale (exprimée par la hauteur équivalente d'un plateau théorique H) de la colonne en fonction de la température, d'après l'équation de De Wer et Pretorius reliant ces deux paramètres : $H = A + B/T + CT$.
Dans le cas de mélanges complexes, il est difficile d'établir une valeur optimale unique de la température pour tous les constituants. La programmation de température joue alors un rôle analogue à celui d'un gradient d'élution en CLHP et permet d'effectuer de bonnes séparations dans un temps raisonnable.




Hidden page

(*fig. 8*) (ex. : capture d'électrons et photométrie de flamme pour un mélange de pesticides organochlorés et organophosphorés et/ou soufrés).
De même, en spectrométrie de masse, la possibilité de suivre un ion caractéristique de la molécule judicieusement sélectionné permet de résoudre ces interférences.
L'identification d'une substance inconnue peut aussi être facilitée par la détermination de son indice de Kovats (I) sur une phase stationnaire donnée et sa comparaison avec une bibliothèque répertoriant les indices de nombreux composés. Ces indices sont établis par rapport à la rétention spécifique d'une série de paraffines linéaires (ex. : nonane, I = 900).

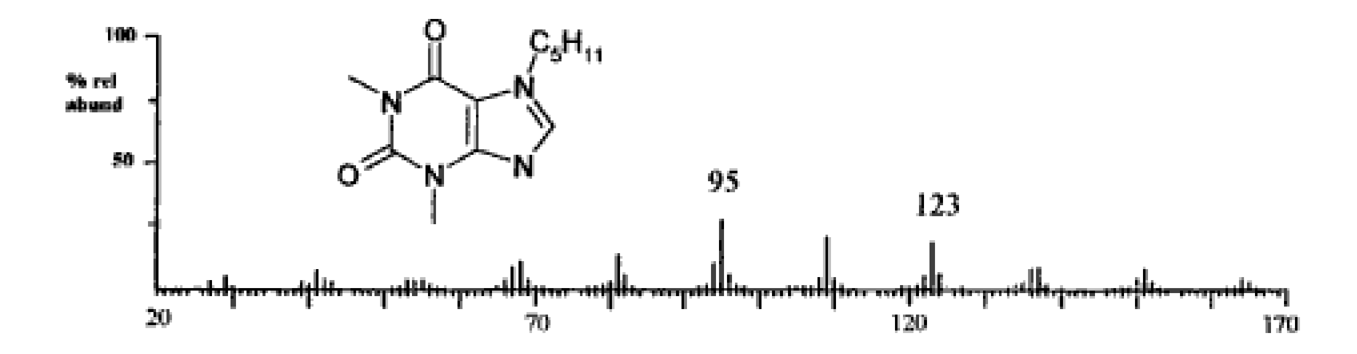
3. Couplage CPG-SM

Le spectromètre de masse peut être utilisé selon deux modes différents d'acquisition :
- en *mode qualitatif*, permettant l'obtention du spectre de masse de chacun des solutés chromatographiés et leur identification ;
- en *mode quantitatif*, fondé sur son utilisation comme détecteur spécifique d'ions caractéristiques choisis dans le spectre de masse.

a) Analyse qualitative

Dans ce mode de fonctionnement (mode d'acquisition avec enregistrement du courant ionique total), le spectre de masse de l'effluent chromatographique est mesuré périodiquement, généralement toutes les secondes, voire moins (200 ms), et cette mesure doit être très rapide, surtout si l'on utilise une colonne capillaire avec laquelle les solutés élués sortent de la colonne en quelques secondes seulement. Le domaine de masses balayées par l'analyseur doit être également choisi, et ce en fonction du type de molécules étudiées.
Les variations du courant ionique total (somme de l'abondance de tous les ions du spectre) en fonction du temps donnent un tracé chromatographique comparable à celui que l'on obtiendrait avec un détecteur à ionisation de flamme.
L'analyse qualitative d'un soluté s'effectue par l'étude de son spectre de masse, consistant :
- soit à interpréter les principaux processus de fragmentation de la molécule et qui donnent des renseignements structuraux capables de conduire à son identification ;
- soit à rechercher son identité par la comparaison du spectre de masse obtenu à ceux d'une bibliothèque, interrogée par l'ordinateur.

L'exemple de spectre proposé (*fig. 10*) est celui du dérivé N-pentylé de la théophylline, dérivé formé pour améliorer la chromatographie du composé. Dans ce spectre de masse, l'abondance du pic parent à m/z 250 reflète la stabilisation par résonance de la structure bicyclique de cette molécule. Les principales voies de fragmentation mettent en jeu des coupures de la chaîne N-pentylée et donnent les ions à m/z 221 ($M - C_2H_5$), m/z 207 ($M - C_3H_7$), m/z 194 ($M - C_4H_8$), m/z 193 ($M - C_4H_9$) et le pic de base à m/z 180 ($M - C_5H_{10}$). Le pic de base, en perdant successivement les fragments neutres $CONHCH_3$, puis CO aux dépens du cycle pyridinique, donne respectivement naissance aux ions m/z 123 et m/z 95.



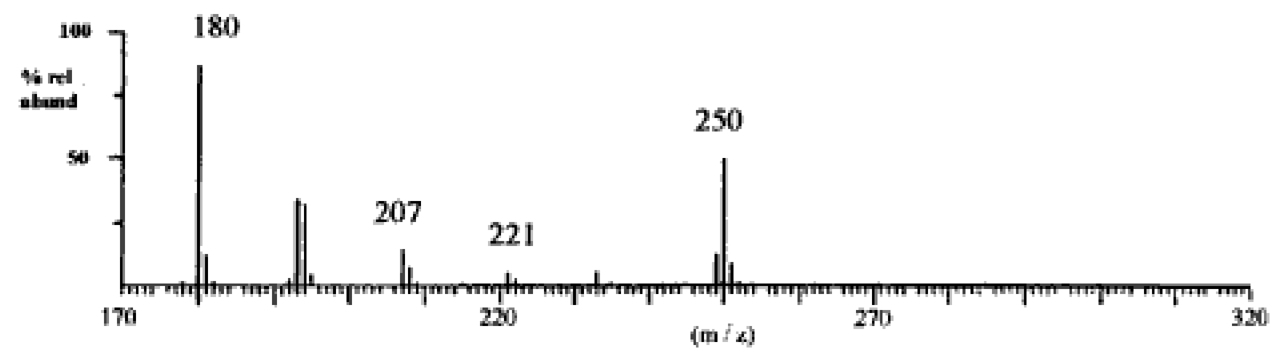


Figure 10. Spectre de masse, en impact électronique, de la théophylline N-pentylée

Avec ce mode d'ionisation énergique, il arrive relativement souvent que l'on ne retrouve pas (ou avec une très faible abondance), l'ion parent. C'est l'inconvénient majeur de cette technique et la détermination ou la confirmation du poids moléculaire doit faire alors appel à une méthode d'ionisation plus douce. C'est ainsi qu'en ionisation chimique, le spectre de masse du dérivé N-pentylé de la théophylline est extrêmement simple (*fig. 11*). On peut observer l'ion à m/z 251 de la molécule protonée $(M + H)^+$, pic de base du spectre, accompagné des ions à m/z 279 $(M + C_2H_5)^+$ et m/z 291 $(M + C_3H_5)^+$ et noter l'absence totale de fragmentation.
L'ionisation chimique et l'impact électronique apparaissent comme deux modes d'ionisation complémentaires.

b) Analyse quantitative

L'analyseur de masse, dans ce cas, est réglé de manière à ne filtrer que certains ions qui ont été préalablement choisis dans le spectre de masse des substances à analyser d'où le nom de la méthode, dite par *sélection d'ions multiples* (SIM). Le choix de ces ions s'effectue selon des critères de sensibilité (ions d'abondance importante) et de spécificité (ions de plus haute masse, pour lesquels le risque d'interférence est minimisé). On obtient ainsi des *chromatogrammes d'ions* pour lesquels la surface des pics est intégrée. La limite de détection est de l'ordre du *picogramme injecté*.
En analyse quantitative par CPG-SM, l'utilisation, comme étalon interne, de molécules de la même espèce chimique que celles à doser, mais marquées par des isotopes stables (D, ^{13}C, ^{15}N...) est possible et améliore considérablement la précision et la justesse des résultats. Ce type d'étalon interne peut être considéré comme l'étalon interne idéal, puisqu'il se comporte d'une manière identique à la molécule

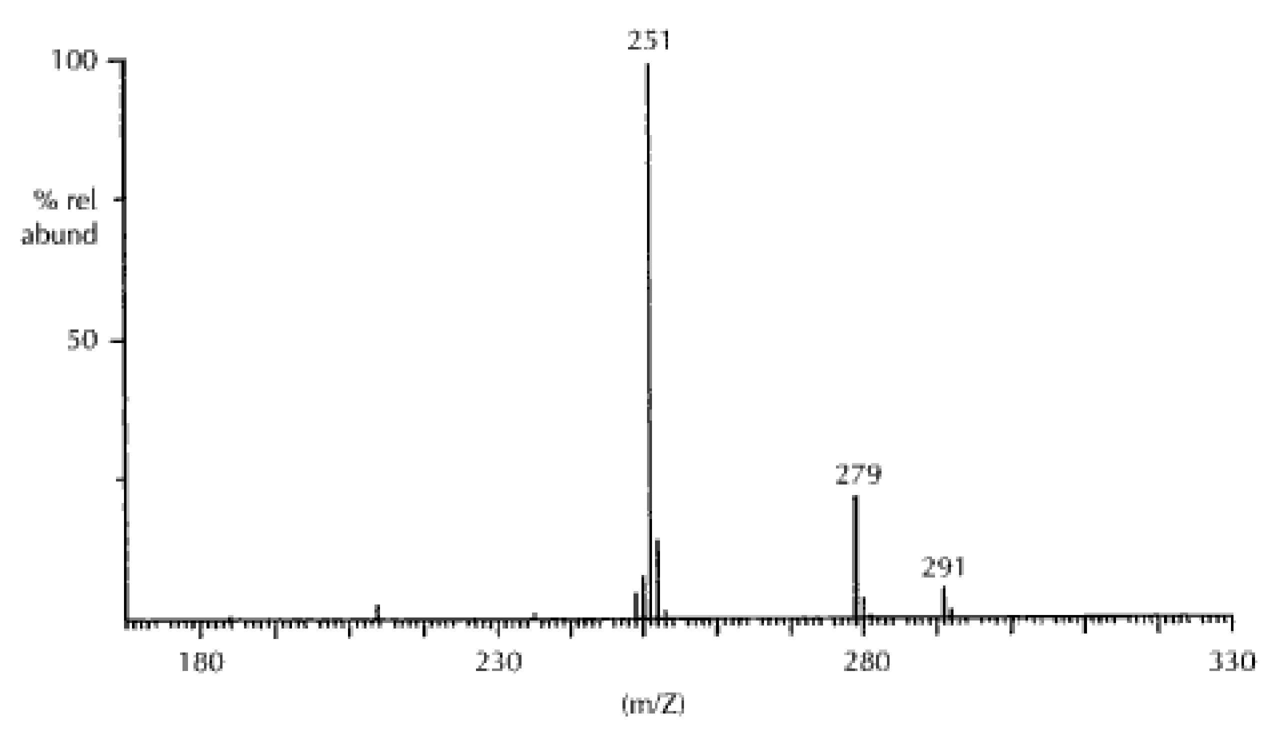


Figure 11. Spectre de masse, en ionisation chimique, de la théophylline pentylée

à doser, dans tous les processus physiques ou chimiques de la préparation des échantillons.
Ainsi, dans l'exemple du dosage par CPG-SM de la théophylline sous forme de dérivé N-pentylé, l'étalon interne utilisé est la 1,3-^{15}N-théophylline marquée par deux atomes d'azote ^{15}N sur le cycle pyrimidique (spectre de masse, *fig. 12*).

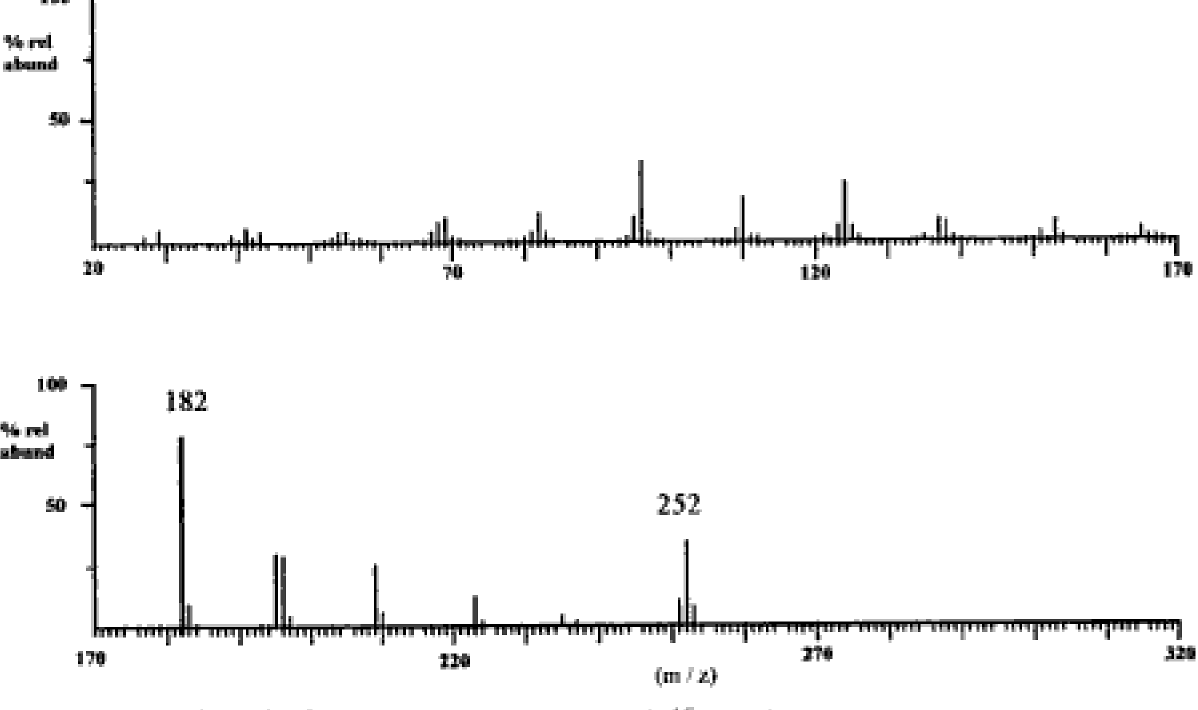


Figure 12. Spectre de masse de la 1,3-^{15} N-théophylline pentylée

Les ions choisis pour le dosage en SIM et en impact électronique sont les ions à m/z 250 et 180 pour la théophylline et 252 et 182 pour la théophylline marquée (*fig. 13*). Le suivi de deux ions caractéristiques pour une même molécule permet de s'assurer de l'absence de toute interférence.

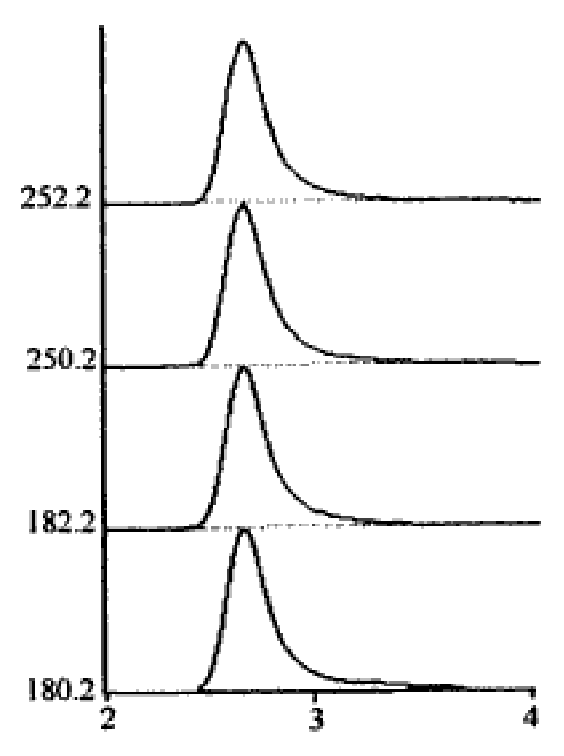


Figure 13. Chromatogramme d'ions d'un extrait plasmatique

Grâce à sa grande sensibilité et son extrême spécificité, cette méthode de dosage trouve de multiples applications dans les domaines les plus variés et plus particulièrement en biologie clinique en tant que méthode de référence, ainsi qu'en pharmacocinétique.

D. Optimisation de la quantification

Compte tenu des faibles volumes d'échantillon injectés (de l'ordre du microlitre), il est difficile de réaliser une prise d'essai reproductible et précise, et l'on a donc recours à une méthode d'étalonnage (*fig. 14*).

1. Normalisation interne

Calcul du pourcentage d'un composé dans un mélange, cette méthode implique que la totalité des constituants du mélange soit éluée. Elle est utilisée en particulier pour l'analyse des huiles essentielles ou comme méthode semi-quantitative dans les études de métabolisme.

2. Méthode des ajouts dosés

Comparaison des aires obtenues avant et après ajout d'une quantité connue de composé à doser, la méthode nécessite une bonne linéarité de la réponse du détecteur. Elle est réservée au cas du dosage de substances physiologiques dans les

B. Milieux biologiques

La complexité des milieux biologiques nécessite une mise au point préalable rigoureuse des modalités d'extraction et de purification, indispensable pour obtenir une analyse chromatographique fiable et sensible. En raison de sa spécificité et de sa sensibilité, la chromatographie en phase gazeuse s'avère une méthode de choix pour le dosage du médicament dans ces milieux :

- études de *biodisponibilité* : détermination des paramètres pharmacocinétiques ;
- études *métaboliques* : identification des métabolites après détection en spectrométrie de masse ;
- *suivi thérapeutique* au cours d'un traitement.

La CPG et la CPG-SM sont également utilisées pour certains *composés biochimiques*, tels que les acides aminés, les stéroïdes, les osamines, et notamment en hormonologie pour le dosage des 17-cétostéroïdes et des œstrogènes.

En *toxicologie*, la CPG-SM est très largement utilisée pour la recherche et le dosage des drogues, amphétamines, cannabinoïdes, cocaïne et opiacés dans les contrôles de dopage et de dépistage de toxicomanie.

C. Agroalimentaire

Parmi les nombreuses applications de la chromatographie en phase gazeuse, nous citerons deux catégories de composés ayant un rapport avec la santé, les pesticides et les nitrosamines :

- les *pesticides* sont recherchés dans les eaux, les produits agricoles d'origine animale (produits laitiers) ou végétale (légumes, fruits) ; leur analyse met en œuvre une phase stationnaire classique (méthylsilicone) et divers détecteurs : capture d'électrons (organochlorés), thermo-ionique (azotés et organophosphorés), photomètre de flamme (organophosphorés et soufrés) ;

les *nitrosamines* sont recherchées dans l'atmosphère (pollution, fumée de tabac) et les produits de charcuterie et salaisons (par transformation des nitrites) ; leur analyse implique l'emploi d'un détecteur spécifique particulier par chimiluminescence.

L'essentiel de la question

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation des constituants d'un mélange, fondée sur la migration différentielle de composés gazeux ou volatils, au sein d'une phase stationnaire solide ou liquide, par entraînement à l'aide d'une phase mobile gazeuse.

Le premier volet de cet article, consacré à l'appareillage, est axé sur les deux organes essentiels d'un chromatographe : la colonne et le détecteur. En ce qui concerne les détecteurs, l'accent a été mis sur le spectromètre de masse, outil performant indispensable tant sur le plan qualitatif, identification des composés, que sur le plan quantitatif, avec en outre la possibilité d'utiliser l'étalon interne « idéal » marqué aux isotopes stables.

B. Supports

Les deux axes principaux de développement de ces supports ont été d'aboutir à des phases stationnaires résistant aux pertes de charge rencontrées en chromatographie liquide haute performance et d'obtenir des pics fins (c'est-à-dire une bonne efficacité). La plupart de ces matrices sont utilisées sous forme de grains ou bien de fine couche déposée sur des microbilles.

1. Résines

La matrice est constituée par un réseau macromoléculaire tridimensionnel, le plus souvent un copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB), sur lequel sont greffés les groupements fonctionnels (SO_3H par exemple). En présence d'eau, on observe un « gonflement » de la résine après formation en son sein d'une solution hyperconcentrée en H^+ après dissociation de $-SO_3H$ en et H^+. L'augmentation résultante de la pression osmotique provoque une migration de l'eau à l'intérieur de la résine, une tension des liaisons entre les carbones des chaînes hydrocarbonées. Ce gonflement dépend directement du pourcentage en poids de divinylbenzène dans le copolymère (encore appelé taux de pontage qui définit la réticulation du gel). La structure du polymère détermine les propriétés mécaniques du support (résistance à la pression) et la facilité d'accès des différentes espèces aux sites échangeurs ce qui régit en particulier l'efficacité. La résistance à la pression augmente avec la réticulation contrairement à l'efficacité.

Les polymères microporeux présentent des pores répartis de manière uniforme dans le polymère. La porosité est déterminée par le taux de pontage. Une valeur de 8 % de celui-ci constitue un bon compromis puisqu'elle permet d'obtenir une bonne résistance mécanique et une bonne efficacité. Si cette valeur augmente non seulement l'efficacité diminue mais des phénomènes d'exclusion stériques peuvent intervenir.

Les polymères macroporeux présentent un taux de pontage élevé (bonne résistance mécanique) et contiennent dans leur structure des pores de grandes dimensions ce qui a pour conséquence un transfert de masse rapide (efficacité élevée).

En raison de la répartition des groupements fonctionnels dans tout le volume du grain, la capacité d'échange CE des résines échangeuses d'ions est élevée, de l'ordre de 3 à 5 $mEq.g^{-1}$. De plus, ce type de support résiste très bien à des solutions aqueuses de pH extrêmes utilisées en chromatographie d'échange d'ions.

2. Échangeurs pelliculaires

La résine échangeuse d'ions décrite précédemment est déposée sur des microbilles de verre (30 à 50 mm de diamètre) en une couche mince (de l'ordre du micromètre). La résistance mécanique d'un tel support est excellente et la vitesse élevée du transfert de masse conduit à une bonne efficacité. Leur principal inconvénient est leur très faible capacité d'échange (plusieurs centaines de fois plus faible que celles des résines). Ce caractère limite leur utilisation en chromatographie analytique en particulier quand la sensibilité insuffisante de la détection impose l'injection d'une assez grande quantité de solutés. De tels supports ne sont pratiquement plus utilisés aujourd'hui.

3. Silices

Les silices présentent une excellente résistance mécanique, très supérieure à celle des polymères, fussent-ils macroporeux, ce qui permet l'utilisation de hautes pressions et ainsi des débits élevés réduisant le temps d'analyse. Les fines granulométries disponibles (3 à 5 µm) assurent des efficacités élevées. Leur capacité d'échange est comprise entre 0,05 et 1 $mEq.g^{-1}$. En revanche, ces supports sont limités à un domaine de pH utilisable entre 2 et 7.

II. Mécanismes de rétention

Plusieurs mécanismes de rétention se superposent fréquemment à la simple interaction ionique. Quelquefois, seules ces interactions secondaires permettent la séparation.

A. Échange d'ions simple

Dans le cas d'une résine ionisée, par exemple échangeuse de cations (c'est-à-dire fixant des ions A^+) et placée en contact d'une solution contenant des ions B^+, il s'établit un équilibre d'échange d'ions :

$$A^+_{stat.} + B^+_{mob.} \rightleftharpoons A^+_{mob.} + B^+_{stat.}$$

stat. et mob. caractérisant la présence de l'ion sur l'échangeur ou dans la phase mobile respectivement. L'équilibre est caractérisé par une constante d'échange (sélectivité α) :

$$\alpha = \frac{|B^+|_{stat.}|A^+|_{mob.}}{|B^+|_{mob.}|A^+|_{stat.}} = \frac{K_B}{K_A},$$

K_A et K_B étant les coefficients de distribution (rapport des concentrations de l'ion dans les deux phases) de A^+ et de B^+ respectivement.
La constante α dépend de la différence d'affinité de la résine pour les ions A^+ et B^+ solvatés. D'une façon générale, l'affinité est d'autant plus grande que l'ion est d'une part plus chargé et d'autre part plus petit (il s'agit de la taille de la forme solvatée). Ainsi par exemple pour un échangeur d'ions de type ammonium quaternaire l'ordre décroissant d'affinité sera :

$$\text{citrate} > SO_4^{2-} > \text{oxalate} > NO_3^- > Cl^- > \text{formiate} > \text{acétate} > OH^- > F^-$$

C'est-à-dire que, par exemple, l'ion citrate sera élué plus tardivement que l'ion acétate.
Pour les échangeurs d'ions de type sulfonate l'ordre décroissant d'affinité sera :

$$Ca^{2+} > Cu^{2+} > Mg^{2+} > K^+ > NH^+_4 > Na^+ > H^+ > Li^+$$

Par exemple, le Ca^{2+} sera élué plus tardivement que le K^+.
De la même façon, un ion B^+, utilisé dans la composition de la phase mobile, sera d'autant plus éluant qu'il aura d'affinité pour l'échangeur, c'est-à-dire qu'il déplacera l'équilibre précédemment décrit vers la droite.

L'élution des espèces peut être obtenue à l'aide d'une phase mobile contenant un ligande éluant (l'ammoniaque).

D. Autres phénomènes mis en jeu

1. Équilibre de Donnan – Exclusion d'ions

Ce type de rétention est dû à un mécanisme de partage des solutés entre les deux phases. Il est observé à la fois pour des solutés ioniques et non ioniques.
Dans le cas d'un échangeur de cations à groupements sulfonate, sous forme Na^+, au contact d'une solution aqueuse de chlorure de sodium, il ne peut se produire d'échange de cations puisque le cation est le même, ici le Na^+. En revanche, du chlorure de sodium peut pénétrer par partage dans l'échangeur. Le partage d'un tel soluté ionique est en principe très faible puisque les groupements fonctionnels ionisés excluent les ions Cl^- de même signe de la phase stationnaire. Des solutés non ioniques, et en particulier de très nombreuses molécules organiques, ne sont pas sujets à ce mécanisme d'exclusion et pénètrent sans problème dans l'échangeur. Le partage est régi par l'ensemble des interactions non ioniques en particulier hydrophobes auquel sont soumises les molécules organiques.
Les monosaccharides peuvent être séparés par partage sur résines échangeuses d'ions de type sulfonate avec comme phase mobile de l'eau pure.
La séparation des acides mono-, di- et trichloracétique (dont les pK_a respectifs sont 2,8, 1,4 et 0,7) est fondée sur le même mécanisme. À pH supérieur à 3, les deux acides les plus forts sont exclus de la résine échangeuse de cations et élués non séparés au temps de rétention nulle. Par contre, l'acide le plus faible, non totalement ionisé, se partage par équilibre de Donnan, et présente un temps de rétention non nul. À pH 2, l'ionisation de l'acide dichloracétique (de pK_a 1,4) diminue, entraînant une diminution de son exclusion de la résine et une augmentation de son temps de rétention.

2. Interactions avec le support

Certains composés hydrophobes peuvent présenter des rétentions élevées, non explicables par le seul mécanisme d'échange d'ions et dues à des interactions de type hydrophobe. Ce mode de rétention particulier des solutés, appelé aussi « mixed mode », fait intervenir les deux interactions en coopération.
Il est mis en évidence dans deux cas :

- quand le support utilisé est une résine (PS-DVB, par exemple) présentant de nombreux noyaux aromatiques. Les électrons π des liaisons multiples du réseau sont alors mis en jeu dans les interactions ;
- lors de l'utilisation de support, à base de silice présentant une bifonctionnalité (greffons octadécyle et échangeur de cations forts ou d'anions forts), ou constitué d'un mélange de silices octadécylsilylée et greffée par un groupement ionique (« lit mélangé »).

Ces phases stationnaires sont utilisées pour l'analyse de composés hydrophobes ionisés ou ionisables et améliorent aussi bien leur rétention durant les différentes étapes d'une extraction liquide solide que la sélectivité lors de leur séparation chromatographique.

III. Phase mobile – Optimisation de la séparation

A. pH

Le soluté est d'autant plus retenu qu'il est plus ionisé. Le pH choisi est en principe proche des pK_a des solutés à séparer (un écart par rapport aux pK_a de 1 à 1,5 unité). Dans le cas de solutés à caractère acide ou base faibles il est possible de procéder à une élution sélective en fonction des pK_a, en modifiant le pH de la phase mobile.

Le pH de la phase mobile peut aussi définir le degré d'ionisation des groupements acide ou basique faibles (de types –COOH et $-NH_2$) et faire ainsi varier la capacité disponible CD.

Le pH est contrôlé et maintenu constant grâce à un tampon. Les tampons généralement utilisés sont les tampons citrate, formiate, acétate ou phosphate à pH acide et les tampons ammoniaque ou borate à pH basique. L'utilisation de tampon phosphate à pH très basique est déconseillée, en effet c'est l'espèce PO_4^{3-} très fortement retenue par l'échangeur qui est majoritaire dans ce cas.

B. Nature de l'ion éluant

La charge et la taille de l'ion interviennent principalement. Ainsi un ion doublement chargé est-il plus éluant qu'un ion ne portant qu'une seule charge. À charge égale, un ion de plus petite taille (sous forme solvatée) est plus éluant (*cf. supra, « Échange d'ions simple »*).

C. Force ionique

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de l'élution d'un ion B^+ par un ion développeur (ou éluant) A^+, l'équilibre d'échange d'ions

$$A^+_{stat.} + B^+_{mob.} \rightleftharpoons A^+_{mob.} + B^+_{stat.}$$

est caractérisé par une constante d'échange (sélectivité)

$$\alpha = \frac{|B^+|_{stat.}|A^+|_{mob.}}{|B^+|_{mob.}|A^+|_{stat.}} = K_B\frac{|A^+|_{mob.}}{|A^+|_{stat.}} = K_B\frac{|A^+|_{mob.}}{CD}$$

or, $k'_B = K_B\frac{V_{stat.}}{V_{mob.}}$, où $V_{stat.}$ et $V_{mob.}$ sont respectivement les volumes de phases stationnaire et mobile dans la colonne,

donc, $k'_B = \alpha\frac{V_{stat.}}{V_{mob.}}\frac{CD}{|A^+|_{mob.}}$.

Le temps de rétention d'un ion sera d'autant plus élevé que la concentration de l'ion éluant A^+ dans la phase mobile sera faible et que la capacité disponible de la colonne sera élevée.

La force ionique peut être ajustée par la concentration du tampon ou par un sel neutre, comme par exemple $NaNO_3$ présentant une force éluante moyenne avec un échangeur d'ions de type ammonium quaternaire.

D. Solvants organiques

La phase mobile en chromatographie d'échange d'ions peut être composée de 3 à 10 % de solvant organique tel que le méthanol, l'acétonitrile ou le propanol. Ils permettent dans certains cas d'améliorer la sélectivité, l'efficacité, ou tout simplement de diminuer la rétention des solutés, en particulier si une interaction hydrophobe s'ajoute à l'interaction ionique. Dans le cas d'interaction ionique pure, sans intervention d'interaction hydrophobe, les effets observés sont vraisemblablement dus à des modifications de solvatation des espèces à séparer ainsi que des groupements fonctionnels de l'échangeur.

E. Température

La température joue sur la cinétique des échanges. Une augmentation de la température permet d'augmenter l'efficacité de la colonne chromatographique et ainsi d'obtenir des pics plus fins. Une température de 50 °C à 80 °C est généralement recommandée dans ce but. Néanmoins, certains échangeurs sont moins stables quand la température augmente. De plus, l'analyse des molécules biologiques (enzyme…) est fréquemment réalisée à température ambiante pour éviter les phénomènes de dénaturation de ces solutés.

IV. Détections

La détection des solutés est un maillon essentiel lors d'une séparation chromatographique. En chromatographie d'échange d'ions, trois modes de détection sont utilisables : la détection directe exploitant une propriété spécifique du soluté permettant de visualiser le pic (détections électrochimique et absorptiométrique), la détection indirecte qui utilise une propriété spécifique de l'espèce éluante permettant de suivre la variation de sa concentration accompagnant l'élution du soluté (détection par diminution d'absorbance) et la détection différentielle, qui exploite les différences de propriétés entre le soluté et l'espèce éluante, liées aux variations de concentration de ces espèces (détections conductimétrique et réfractométrique).

A. Détections absorptiométriques

1. Détection UV directe

Elle s'effectue par la mesure de l'absorbance des solutés directement en sortie de colonne, en opérant avec un éluant transparent à la longueur d'onde de détection.

Cette méthode d'une grande facilité d'emploi s'applique à la détection d'anions inorganiques (nitrate...). Des ions organiques contenant des groupements chromophores (nucléosides, dérivés de la pyridine) et présentant une absorption dans l'ultraviolet sont détectés facilement à 254 nm.

2. Détection UV indirecte

Elle s'effectue par mesure de la diminution de l'absorbance en opérant à une longueur d'onde où seul l'ion éluant absorbe. L'élution de chaque soluté entraîne une diminution de l'absorbance proportionnelle à ce dernier dans l'effluent. Les éluants utilisés sont généralement des phtalates, sulfobenzoates, pyromellitates qui présentent un coefficient d'absorption élevé à la longueur d'onde de travail. Ce mode de détection a été utilisé lors de la séparation d'halogénures (Br^-, Cl^-) sur colonne échangeuse en présence d'un tampon pyromellitate.

3. Détection par formation de dérivés

Certaines séries de molécules, en particulier les acides aminés, présentent une grande hétérogénéité dans leurs propriétés spectrales : la glycine absorbe peu à 210 nm et le tryptophane présente à 254 nm un coefficient d'absorption élevé. Une dérivation des molécules s'avère nécessaire. La plus classique consiste en la réaction post-colonne des acides aminés avec de la ninhydrine pour former des composés colorés présentant des maxima à 440 nm et 570 nm.

B. Détection différentielle

1. Conductimétrie

Cette technique est particulièrement intéressante pour la détection d'ions n'absorbant pas en UV et ainsi difficilement détectables. Ce mode de détection est fondé sur la propriété caractéristique des ions de conduire le courant en solution aqueuse. Elle consiste en la mesure de la conductivité de la phase mobile à la sortie de la colonne. La réponse du détecteur est proportionnelle, entre autres, à la différence des conductivités ioniques des ions de l'échantillon et de l'éluant. Une bonne détectabilité implique que cette différence soit aussi grande que possible. La phase mobile exempte de solutés doit donc présenter une conductivité la plus faible possible en arrivant au détecteur.
Deux méthodes ont été développées dans ce sens. Dans le cas d'une phase éluante présentant une conductibilité élevée, les ions de l'effluent sont éliminés en les fixant sur une colonne dite de « neutralisation » avant détection. Dans le cas de la séparation de cations alcalins, Na^+, K^+ et Li^+, il est possible d'utiliser, pour la colonne analytique, par exemple une résine de type sulfonate $-SO_3^-$, l'élution peut être obtenue par une solution d'acide chlorhydrique H^+, Cl^-. Les cations Na^+, K^+ et Li^+ sont élués séparément mais en présence d'une grande concentration de protons et de chlorures. La conductivité de la phase mobile en sortie de colonne est élevée et ne permet pas une détection conductimétrique. À la suite de la colonne analytique est alors placée une colonne de neutralisation ou de « suppression » d'ions,

Dans le cas de la chromatographie d'exclusion-diffusion pure, la séparation est donc fondée non sur les interactions physicochimiques avec la phase stationnaire, mais sur les différences de taille des molécules en solution.
Remarques : l'exemple ci-dessus est caricatural :
- le plus souvent les solutés diffusent dans la phase stationnaire (solutés de tailles voisines), cependant ils y diffusent différemment, ce qui permet leur séparation ;
- Dans toute chromatographie, très souvent, il peut y avoir superposition de plusieurs types de phénomènes – adsorption, échange d'ions (c'est le cas lorsque le substrat du gel s'altère en libérant des groupements ionisables : $-CH_2OH$, $-COOH$). Il s'y ajoute même des phénomènes de partages lors de l'élution avec un solvant non miscible à celui qui remplit les pores.

Ces phénomènes sont dans certains cas volontairement exaltés pour accroître la spécificité des séparations (exemple : chromatographie d'affinité sur gel de dextrane modifié).

IV. Théorie

Les grandeurs fondamentales, définies ci-dessous et adaptées à la chromatographie d'exclusion-diffusion, découlent de la théorie générale de la chromatographie en phase liquide.

A. Volume de rétention : V_R

Le volume de rétention V_R de molécules X est donné par la relation :

$$V_R = V_M + K \cdot f \cdot V_P$$

Remarque : les substances ne diffusant pas et n'étant pas retenues dans la colonne ont amené certains auteurs à préférer le terme de volume d'élution V_E à celui de volume de rétention.
V_M : volume interstitiel de la colonne ou volume extragranulaire : c'est le volume de la phase mobile.
K : coefficient de distribution des molécules X.

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

C_S : concentration des molécules X dans la phase stationnaire = $[X]_S$
C_M : concentration des molécules X dans la phase mobile = $[X]_M$
V_P : volume des pores de la phase stationnaire ou volume de solvant immobilisé dans le gel
f : fraction du volume poreux de la phase stationnaire accessible aux molécules X.
f est un nombre sans dimension : $0 < f < 1$
Le volume total de la colonne V_T est relié à V_M et V_P par la relation

$$V_T = V_M + V_P + V_G$$

C. Facteurs influençant la séparation

(Pour plus de détails le lecteur consultera les articles traitant des grandeurs fondamentales en chromatographie.)
Dans toutes les chromatographies le problème pratique le plus important est la recherche de la résolution assurant une séparation suffisante des solutés du mélange à analyser. L'équation générale de la résolution, dans le cas de la séparation de deux substances S_1 et S_2, est donnée par :

$$R_S = \underbrace{\frac{1}{4}\frac{(\alpha - 1)}{\alpha}}_{I} \; \underbrace{\frac{(k'_2)}{(1 + k'_2)}}_{II} \cdot \underbrace{N_2^{1/2}}_{III}$$

Pour accroître R_S il est possible d'augmenter les facteurs I, II, III.
I : le terme en α exprime l'influence de la sélectivité.
II : le terme en k'_2 exprime l'influence du facteur de capacité.
III : le terme en N_2 exprime l'influence de l'efficacité de la colonne.
En chromatographie d'exclusion-diffusion, les possibilités d'améliorer les séparations, lorsque la phase stationnaire est choisie, sont assez restreintes comme le montrent les différents facteurs exprimant la résolution R_S.

1. Sélectivité ou rétention relative

Le facteur de sélectivité α (ou rétention relative) est défini par la relation :

$$\alpha = \frac{T_{R_1} - T_0}{T_{R_2} - T_0}$$

T_0 = temps de rétention d'une substance non retenue
T_{R_2} = temps de rétention de la substance la plus retenue
$T_{R_2} > T_{R_1}$
Il sert à mesurer la distance séparant les deux pics consécutifs correspondant aux substances S_1 et S_2 sur le chromatogramme. Il représente donc la différence de comportement des molécules étudiées, c'est-à-dire la différence de distribution des deux composés. Cette différence est liée à :
- la taille des molécules ;
- la porosité des gels ;
- l'uniformité de la taille des pores.

Par conséquent, en chromatographie d'exclusion-diffusion, pour augmenter la sélectivité, il faut utiliser une phase stationnaire de porosité homogène et dont la taille des pores est proche de celle des molécules à séparer.
Les phases stationnaires isoporeuses restreignent le domaine des masses moléculaires exploré. Ceci se traduit sur la courbe log M = f(V_R) par une diminution de la pente (*fig.* 4).

2. Classification

Les phases stationnaires sont habituellement classées en :
- xérogels,
- aérogels : supports rigides.

Les xérogels ne gardent pas leur forme initiale lorsque la phase dispersante est éliminée alors que les aérogels la gardent.

a) Xérogels

Les xérogels peuvent être différenciés en gels mous et en gels semi-rigides selon leur taux de réticulation.

Les gels mous sont souvent utilisés avec des solutions aqueuses (sauf les polystyrènes qui sont hydrophobes). On parle alors parfois de chromatographie par filtration de gel. Ils ne sont utilisables que sous de très faibles pressions (< 2 bars) et à faible débit. Leur facteur de capacité est élevé et peut aller jusqu'à 3.

Les gels semi-rigides ont un taux de pontage plus élevé que précédemment ce qui leur confère des propriétés différentes des gels mous :
- gonflement plus faible ;
- facteurs de capacité compris entre 0,8 et 1,2 ;
- ils supportent des pressions plus élevées (jusqu'à 70 bars) ;
- ils peuvent être utilisés avec des débits élevés ;
- leur nature aromatique hydrophobe fait que la phase mobile est en général un solvant organique. On parle alors de chromatographie de perméation sur gel.

Les principaux xérogels sont présentés ci-dessous :

■ *Gels de dextrane (sephadex…)*

Le dextrane est un polysaccharide traité par l'épichlorhydrine du glycérol, des ponts glycéryles sont ainsi créés entre les chaînes de dextrane. Le taux de réticulation peut être contrôlé et de nombreuses variétés sont disponibles commercialement. La présence de nombreux groupes hydroxyles rendent ces molécules particulièrement hydrophiles et ne peuvent supporter plus de deux heures une solution d'HCl 0,1 N.

De plus, par oxydation certains groupements hydroxyles se transforment en groupements carboxyliques. Ces gels possèdent alors des propriétés d'échangeurs d'ions. Le domaine des masses moléculaires couvert par ces gels varie de 7.10^2 à 8.10^5.

■ *Gels d'agarose (sepharose, biogel A, gélarose, ultrogel A…)*

L'agarose est un polysaccharide linéaire de D-galactose et de 3-6 anhydro L-galactose qui ne contient pas de groupements ionisables. La structure poreuse de ces gels résulte de la formation de liaisons hydrogènes au cours du refroidissement de leurs solutions aqueuses. Ils sont stables en suspension aqueuse à pH 4 – 9. Ces gels de porosité plus élevée que les précédents permettent de séparer des molécules dont la masse moléculaire peut aller de 10^4 à $1,50.10^8$.

Remarque : des matrices composées de dextrane et d'aragose poreux fortement réticulés (superdex…) permettent des séparations préparatives de haute résolution en alliant la grande sélectivité des supports dextrans et la bonne stabilité physique et chimique de l'aragose réticulé.

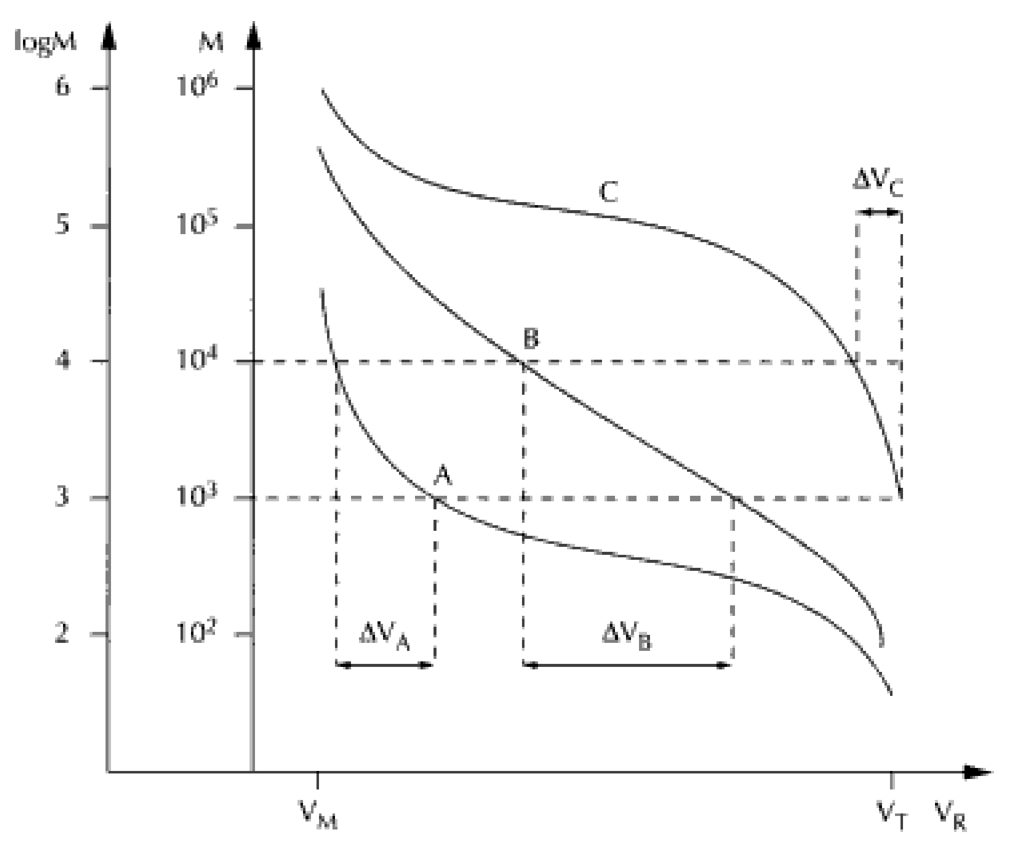


Figure 5. Choix d'une phase stationnaire

A, B, C sont les trois phases testées :
- phase A : les deux substances sont éluées au voisinage du volume interstitiel V_M. La différence des volumes de rétention ΔV_A sera faible ;
- phase C : les deux substances seront pratiquement exclues et seront éluées au voisinage du volume V_T. Ici encore, ΔV_C est très petit ;
- phase B : c'est celle qui donne les meilleurs résultats avec $\Delta V_B = \Delta V_R$ maximum.

Il convient donc de choisir la phase dont la partie linéaire de la courbe d'étalonnage correspond au domaine des masses moléculaires à séparer. Lorsque les masses moléculaires de l'échantillon s'étendent sur un vaste domaine, il est nécessaire d'utiliser plusieurs colonnes en série. Chaque colonne contient alors une phase dont la limite d'exclusion est différente.

B. Phases mobiles

D'une façon générale, une phase mobile doit présenter les propriétés suivantes :
- dissoudre l'échantillon sans dissoudre la phase fixe ;
- gonfler le gel ;
- être compatible avec les systèmes de détection.

1. Pour les gels hydrophiles

L'éluant est en général l'eau lorsque les substances ne sont pas ionisées.
On utilise des solutions d'électrolytes lorsque les gels sont susceptibles d'acquérir des propriétés d'échanges d'ions et que les substances à chromatographier sont

sensible, mais il a l'avantage d'être non spécifique et quasi universel. Le signal est proportionnel à la concentration du polymère analysé. La température doit être régulée très soigneusement.
Remarque : lorsque la chromatographie d'exclusion-diffusion est utilisée pour la mesure des masses moléculaires, on couple souvent le réfractomètre à un détecteur viscosimétrique (ceci en raison de la relation de Mark-Houwink entre la viscosité intrinsèque η d'une solution de polymère et la masse moléculaire du polymère M) :

$$\eta = KM^a \quad \text{K et a sont des constantes.}$$

Détecteurs UV et IR

Ils sont plus utilisés pour l'analyse des mélanges de copolymères en raison de leur sélectivité. En chromatographie d'exclusion-diffusion, les hautes sensibilités du détecteur UV sont rarement atteintes car les polymères n'ont généralement pas d'absorbance élevée aux longueurs d'onde où les phases mobiles absorbent peu.
Parmi les détecteurs photométriques, il est utile de signaler l'avènement du détecteur à barrette de photodiodes (256 à 1 024 photodiodes : chaque diode mesure l'intensité transmise sur une largeur de bande < 2 nm).
L'avantage de cette technologie est que l'intensité transmise est mesurée simultanément sur l'ensemble de l'intervalle spectral accessible (≈ 500 nm). Un microprocesseur est nécessaire pour l'acquisition et le traitement des données.
L'ensemble permet d'établir des chromatogrammes tridimensionnels en fonction de la longueur d'onde, de l'absorbance et du temps en une seule expérimentation.

Autres détecteurs

Actuellement, on emploie aussi comme détecteur de masse les *détecteurs par diffusion de lumière laser* (ils peuvent être couplés aux détecteurs de concentration). Deux techniques sont apparues successivement :

- LALLS (*low angle laser light scattering*) : elle consiste à mesurer la lumière diffusée sous un angle de 5° à 7°. On admet que le signal est directement proportionnel à la masse moléculaire moyenne en poids. Lorsqu'une courbe d'étalonnage en masse moléculaire est réalisée en même temps que l'utilisation de ce type de détecteur, des informations sur l'élution anormale ou sur les ramifications longues du polymère peuvent être obtenues ;
- MALLS (*multiangle laser light scattering*) : cette technique est en plein développement actuellement. Certaines sociétés développent des détecteurs où la lumière diffusée est mesurée sous 16 angles différents. Le plus souvent les mesures peuvent être faites sous trois angles simultanément :
  - à 90° et 15° pour les détecteurs de diffusion Rayleigh. Ces mesures conduisent à la détermination de la masse molaire absolue en accord avec l'équation de Rayleigh,
  - à 90° pour le détecteur de diffusion de lumière dynamique. Il permet de déterminer le rayon hydrodynamique des molécules étudiées par l'intermédiaire de l'équation de Stokes-Einstein.

Rappelons que la détermination des masses moléculaires absolues se fait à l'aide d'un logiciel approprié et sans étalonnage préalable, ce qui constitue un avantage important.

L'ensemble des techniques chromatographiques faisant appel à ce phénomène est regroupé suivant la majorité des auteurs sous le terme général de chromatographie d'exclusion stérique qui comprend :

- la chromatographie par perméation de gel : la phase mobile est de nature organique ;
- la chromatographie par filtration de gel : la phase mobile est aqueuse.
  Selon les cas, il sera possible d'utiliser des gels de dextrane, des gels d'agar et d'agarose, des gels de polyacrylamide et des gels de polystyrène.
- la chromatographie d'exclusion de taille où l'on utilise des silices greffées et non plus des gels. Dans ce cas, des liaisons hydrogènes peuvent s'établir avec de nombreux solutés polaires.

Toute la chromatographie est basée sur deux caractéristiques du système :

- la sélectivité qui traduit la différence d'affinité des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire (substrat du gel) ;
- l'efficacité que mesure l'étroitesse des zones où sont concentrées les solutés après séparation.

Dans le cas de la chromatographie d'exclusion-diffusion pure, la séparation est fondée, non sur les interactions physicochimiques avec la phase stationnaire, mais sur les différences de taille des molécules en solution. Les grandeurs fondamentales adaptées à la chromatographie d'exclusion-diffusion découlent de la théorie générale de la chromatographie en phase liquide.

Le volume de rétention $V_R = V_M + K \cdot f \cdot V_P$ de molécules X dépend essentiellement :

- du coefficient de distribution K

$$K = \frac{[X]_S}{[X]_M}$$

S = phase stationnaire
M = phase mobile

- de f = fraction du volume poreux accessible aux molécules X

$$0 < f < 1$$

- de V_P = volume des pores de la phase stationnaire.

Si K = 1, les molécules diffusent parfaitement et se répartissent de manière identique entre les deux phases. Deux cas limites :

- f = 0 exclusion totale ;
- f = 1 tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux molécules considérées.

Entre ces deux cas limites, V_R varie linéairement en fonction du volume poreux accessible. À chaque valeur de V_R correspond une taille de molécule qui en première approximation est proportionnelle à la masse molaire.

- si K > 1 : exclusion + autres phénomènes de rétention ;
- si K = 0 : les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire.

La chromatographie d'exclusion-diffusion se pratique essentiellement sur colonne (verre, matière plastique, inox). Pour l'application de basse ou de haute pression, une pompe est indispensable pour régulariser le débit. Suivant la nature du gel, des solutés, les solvants éluants peuvent être aqueux ou organiques. La plupart des détecteurs décrits pour la chromatographie liquide haute performance sont utilisables, mais le réfractomètre différentiel, les détecteurs UV et IR et le viscosimètre sont les plus utilisés.

Les deux premiers nécessitent l'étalonnage des colonnes pour la détermination des masses molaires.
La tendance actuelle est d'utiliser les détecteurs à diffusion de lumière qui permettent, outre de nombreux autres renseignements (rayon hydrodynamique…)de mesurer les masses molaires absolues en s'affranchissant de l'étalonnage préalable (ceci suppose que toutes les variables de l'équation de Rayleigh soient connues de manière absolue).
L'association de détecteurs la plus intéressante est la combinaison : réfractomètre, viscosimètre, diffusion de lumière.
Le domaine privilégié de la chromatographie d'exclusion-diffusion est celui de la séparation de polymères ou de macromolécules, de la connaissance de leur masse et de la distribution de leurs ramifications.

Pour en savoir plus

- Barlow C. F., Firemark H., Roth L. J. J. Pharm Pharmacol 1962 ; 9 : 550-5.
- Bengtsson S., Philipson L. Biochim Biophys Acta 1964 ; 79 : 399-406.
- Bio D'estree. Questions complémentaires. Chimie analytique 1985.
- Colman R. F. Anal Biochim 1972 ; 46 : 358-63.
- Dekker M. *Handbook of size exclusion chromatography*. 1995.
- Dubin P. L. *Aqueous size exclusion chromatography*. New York, Elsevier, 1988.
- *Gel Filtration. Principles and Methods*, 5ᵉ éd. Pharmacia, 1991.
- Hunt B. J., Holding S. R. *Size exclusion chromatography published in the USA*. New York, Chapman and Itall, 1989.
- Knobloch J., Shaklee P. Heparin characterization. Analytical Biochemistry 1997 ; 245 : 231- 41.
- *Lesec J. Chromatographie par perméation de gel. Chromatographie d'exclusion stérique. Techniques de l'ingénieur 1994, P2 1465 : 1-11.*
- Mahuzier G., Hamon M., Ferrier D., Prognon P. *Chimie analytique*, tome 2 : *Méthodes de séparation*, 3ᵉ éd. Paris, Masson, 1999.
- Meyer R. V. *Practical high performance liquid chromatography*. Wiley and sons, 1994 : 197-210.
- Rosset R., Caude M., Jardy A. *Chromatographie en phase liquide. Exercices et problèmes.* Masson 1995.
- Rouessac F., Rouessac A. *Analyse chimique*, 2ᵉ éd. Paris, Dunod, 2004.
- Wyatt P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. Analytica Chimica Acta 1993 ; 272 : 1-40.
  Documentation Wyatt Technology.
  Documentation Precision Detectors.
  Documentation Polymer Laboratories.
  Documentation Supelco.
- Sites internet :
  www.viscotek.com ;
  wswww.waters.com ;
  www.interchim.com ;
  www.alltech.com ;
  www.polymerlabs.com ;
  www.dionex.com ;
  www.shimadzu.com ;
  www.laboratoryequipment.com

Principes des méthodes utilisant la réaction antigène-anticorps

A. HERNVANN, Laboratoire de biochimie, hôpital Cochin, AP-HP, Paris.

I. Caractéristiques et obtention des immunsérums

- **A.** Anticorps polyclonaux
- **B.** Anticorps monoclonaux
- **C.** Cas particuliers des haptènes

II. Réactions d'immunoprécipitation

- **A.** Réactions de précipitation en milieu liquide
- **B.** Réactions de précipitation en milieu gélifié

III. Réactions utilisant un marqueur

- **A.** Principes généraux des immunodosages utilisant un marqueur
- **B.** Qualités d'un dosage immunologique
- **C.** Immunodosages utilisant un marqueur radioactif
- **D.** Immunodosages utilisant un marqueur enzymatique
- **E.** Techniques utilisant un marqueur luminescent
- **F.** Techniques multiples simultanées

La préparation des conjugués se déroule en deux temps : synthèse d'un dérivé de l'haptène, puis couplage du dérivé à une protéine porteuse grâce à un agent coupleur. Le plus souvent, il s'agit d'une liaison peptidique entre un groupement carboxylique de l'haptène et un groupement aminé de la protéine. Il existe différentes techniques de couplage utilisant carbodiimide, diisocyanate, anhydride mixte, sel de diazonium ou glutaraldéhyde comme agents coupleurs.

II. Réactions d'immunoprécipitation

Découverte par Krauss en 1897, l'immunoprécipitation connut son véritable essor grâce aux travaux de Heidelberger et Kendall en 1933. Elle résulte de la mise en présence d'un antigène soluble et de l'anticorps homologue qui, en s'associant, forment un complexe immun insoluble. Les réactions d'immunoprécipitation, qualitatives ou quantitatives, sont réalisables en phase liquide ou en milieu gélifié ; ce sont des réactions très spécifiques mais assez peu sensibles par rapport aux techniques utilisant un traceur.

A. Réactions de précipitation en milieu liquide

1. Généralités

La réaction d'immunoprécipitation se développe en deux étapes :
- une étape rapide et spécifique, qui dure quelques minutes, pendant laquelle il y a formation d'un complexe antigène-anticorps ; différentes forces non covalentes sont mises en jeu (forces électrostatiques, liaisons hydrogène, forces de Van der Waals) ;
- une étape lente (plusieurs heures), conséquence de la première étape, qui aboutit à la visualisation de la réaction.

a) Méthode de Heidelberger et Kendall

La méthode de précipitation quantitative de Heidelberger et Kendall est à l'origine de la compréhension des mécanismes de l'immunoprécipitation. Cette technique consiste à introduire dans une série de tubes une quantité fixe d'antisérum, puis des quantités croissantes d'antigène sous un même volume. Un précipité apparaît, faible dans les premiers tubes, puis augmentant d'intensité avec les quantités d'antigène ajoutées jusqu'à un maximum ; l'importance du précipité diminue ensuite pour disparaître dans les derniers tubes.
Après centrifugation, recueil et lavages des précipités, il est possible de réaliser un dosage de l'azote total. Les surnageants sont également récupérés afin de déterminer la présence d'anticorps ou d'antigènes en excès.
Il est ainsi possible de tracer une courbe de précipitation donnant la quantité d'anticorps précipités en fonction de la concentration en antigène (*fig. 2*). L'examen de cette courbe permet de distinguer trois zones :
- une zone d'excès d'anticorps, pour laquelle on ne retrouve pas d'antigènes libres dans le surnageant ;

- Température : une température de 37 °C favorise la formation des complexes, la précipitation est améliorée à 4 °C ;
- Durée d'incubation ;
- Présence de substances interférant dans la réaction.

Les polymères non ioniques augmentent l'immunoprécipitation : dextran, polyvinyl pyrrolidone et surtout polyéthylène glycol (PEG). Ils accélèrent la production de complexes immuns et la formation de réseaux ; l'équilibre de la réaction antigène-anticorps est atteint plus rapidement.

d) Différents types de courbes de précipitation

Deux formes principales de courbes d'immunoprécipitation peuvent être retrouvées :

- la courbe dite de « type lapin » correspond à la courbe classique (*fig.* 2). La précipitation débute dans les premiers tubes, donc avec une faible quantité d'antigène ; les complexes antigènes-anticorps sont insolubles. L'allure du pic peut varier selon les systèmes antigènes-anticorps. Ce type de courbe est obtenu avec les sérums de lapin, les sérums humains mais également avec certains sérums équins dans le cas d'antigènes de nature polyosidique ;
- la courbe de « type cheval » est retrouvée dans des systèmes sérums équins antigènes protéiques. Elle comporte cinq zones (*fig.* 3) : une prézone correspondant à la présence de complexes solubles sans précipité visible, une zone d'excès d'anticorps, une zone d'équivalence, une zone d'excès d'antigène et une postzone où il y a disparition du précipité par formation de complexes solubles.

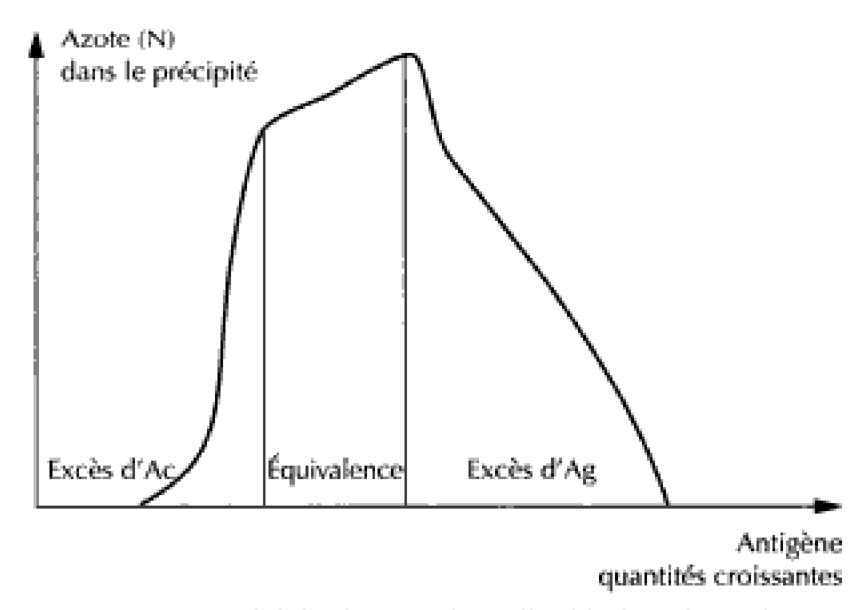


Figure 3. Courbe d'immunoprécipitation en phase liquide (courbe « de type cheval »)

2. Méthodes d'immunoprécipitation en milieu liquide

a) Test de l'anneau (*ring test*)

Le test de l'anneau ou *ring test* s'effectue à l'aide d'un tube de faible diamètre contenant un antisérum. Le dépôt de la solution antigénique à une concentration convenable entraîne l'apparition d'un anneau de précipitation à l'interface des deux liquides. Cette technique, qualitative, est notamment utilisée pour la détermination des groupes antigéniques des streptocoques selon la classification de Lancefield.

f) Causes d'erreur liées à l'excès d'antigène

Ce phénomène est généralement évité en optimisant les conditions opératoires pour permettre des dosages dans toute la zone des concentrations rencontrées en physiopathologie. Cela est cependant parfois impossible par exemple pour les liquides biologiques où des zones de concentration très larges sont rencontrées (LCR, urines), ou dans le cas des immunoglobulines monoclonales.
Différentes solutions peuvent être apportées :

- l'addition d'une quantité déterminée d'anticorps après la mesure : en cas d'excès d'antigène, on observera une augmentation de la lumière diffusée ;
- l'addition d'une quantité déterminée d'antigène : il y aura une augmentation du signal dans les conditions normales, mais pas si l'on se trouve en excès d'antigène ;
- le contrôle visuel des pics, dans le cas des néphélémètres en flux continu ;
- travailler systématiquement sur deux dilutions différentes des échantillons.

B. Réactions de précipitation en milieu gélifié

1. Généralités

Elles sont basées sur le fait que lorsqu'une solution est déposée en un point d'un gel, elle se répartit selon un gradient de concentration.
Pour qu'il y ait diffusion, il est nécessaire que la taille des mailles du gel soit supérieure à la taille des molécules et que le gel conserve son état d'hydratation initial. La diffusion est dépendante de la concentration des composés et de leur constante de diffusion ; celle-ci est fonction de leur masse et de la forme de la molécule. L'immunodiffusion peut être linéaire (par exemple en tube étroit) ou radiale (en plaque).
Les gels utilisés sont des gels de gélose (agar) purifiée ou d'agarose réalisés dans des tampons de pH et de force ionique déterminés. Les gels de polyacrylamide qui ne permettent pas une bonne diffusion sont très rarement utilisés.

2. Méthodes qualitatives

a) Immunodiffusion double (méthode d'Ouchterlony)

La méthode d'Ouchterlony consiste à couler un gel d'agar ou d'agarose sur une faible épaisseur sur une lame de verre ou dans une boîte de Pétri. Après solidification du gel, des puits destinés à recevoir les solutions d'antigène ou d'anticorps sont creusés à l'emporte-pièce dans la gélose.
Antigène et anticorps diffusent lentement à partir des puits de façon radiale selon un gradient de concentration. Au niveau où antigène et anticorps sont dans un rapport de concentration optimal, des arcs de précipitation apparaissent directement ou dans certains cas après coloration.
Il s'agit d'une méthode uniquement qualitative qui permet de comparer divers antigènes en les plaçant dans différents puits face à un puits central contenant l'antisérum (*fig. 4*) :

- si deux puits contigus contiennent le même antigène, les arcs de précipitation se rejoignent : c'est la réaction d'identité totale (a) ;

b) Immunodiffusion radiale (IDR ou méthode de Mancini)

Cette technique utilise des plaques de gélose en couche mince contenant l'anticorps spécifique de l'antigène à doser. Un volume précisément mesuré de la solution d'antigène (échantillon, ou solution de calibration ou de contrôle) est déposé dans un des puits cylindriques creusés dans la gélose. Les plaques sont mises en chambre humide pour éviter la dessiccation du gel. L'antigène diffuse de façon radiale en créant un gradient de concentration en antigène. Au rapport optimal de concentration antigène-anticorps, se produit un disque de précipitation dont le diamètre est fonction de la concentration de l'antigène présente dans l'échantillon. Une droite d'étalonnage est tracée en portant en abscisse la concentration en antigène et en ordonnées le carré du diamètre du disque de précipitation.

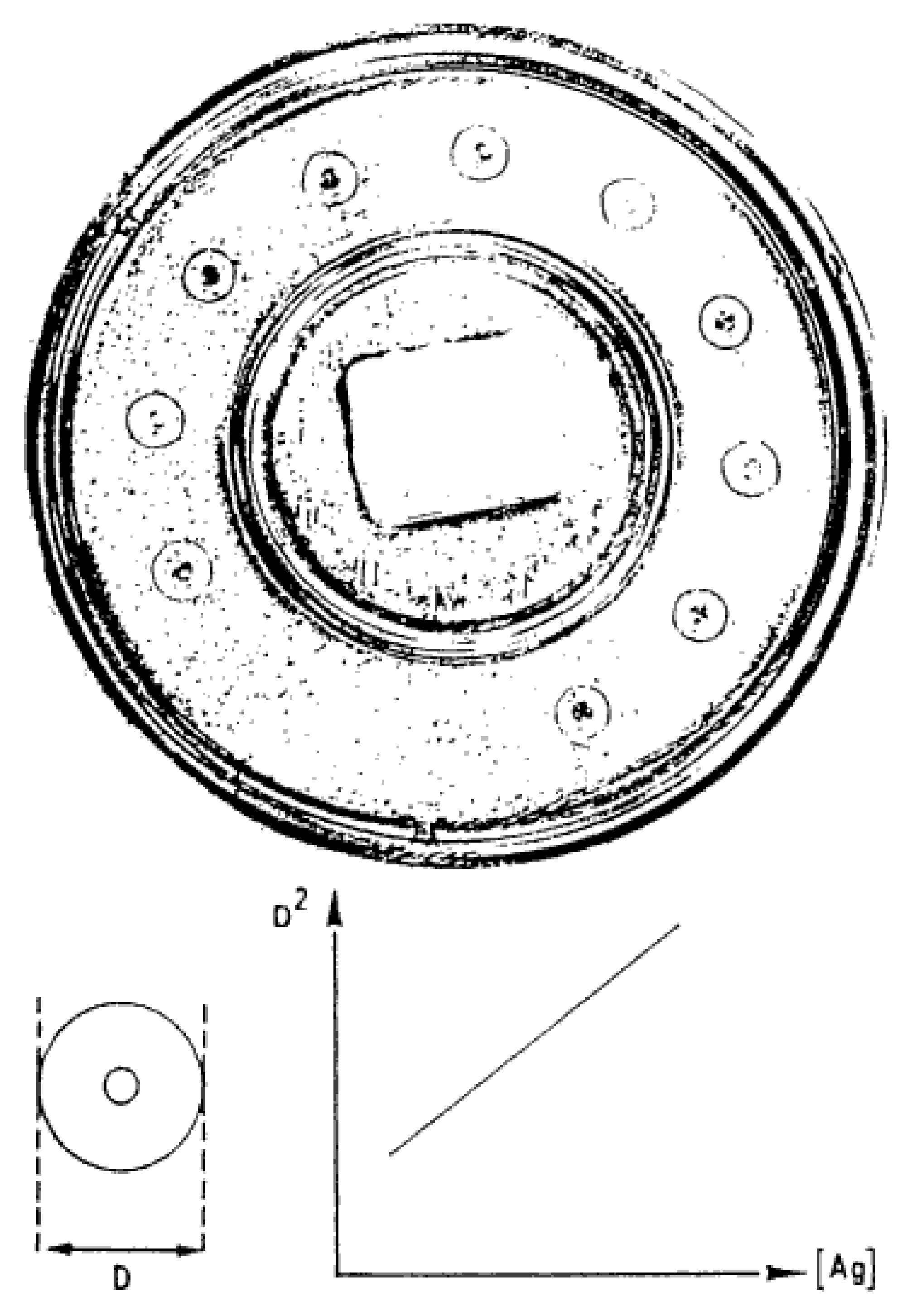


Figure 6. Technique de Mancini (immunodiffusion radiale). Courbe d'étalonnage

Dans une seconde étape, un gel contenant l'anticorps est déposé sur le reste de la plaque et une seconde migration perpendiculaire à la première est réalisée. Chaque fraction révélée se caractérise par une ligne de précipitation en forme de dômes plus ou moins arrondis.
Cette technique est d'interprétation très délicate du fait de l'enchevêtrement des lignes de précipitation, mais elle s'avère très utile pour analyser un mélange complexe d'antigènes ou pour réaliser un dosage quantitatif de nombreuses protéines à la fois.

III. Réactions utilisant un marqueur

C'est en 1956 que Yalow et Berson introduisent une technique radio-immunologique (RIA) de dosage de l'insuline.
Ils montrent que l'addition de quantités croissantes d'insuline dans un milieu contenant des quantités constantes d'anticorps (en concentration limitée) et d'antigènes marqués (traceur) provoque une décroissance du traceur lié aux anticorps.
Depuis trente ans, de nombreuses modifications sont intervenues et ont permis de donner un essor considérable aux méthodes d'immunodosage utilisant un marqueur. Les progrès de l'immunologie ont permis d'obtenir des anticorps polyclonaux de très bonne qualité, puis des anticorps monoclonaux dont l'utilisation améliore la spécificité et la sensibilité des techniques. Grâce à l'apparition de ces derniers, l'évolution s'est orientée vers des techniques utilisant un excès d'anticorps. Pendant longtemps, seuls les marqueurs radioactifs ont été utilisés ; leur principal inconvénient étant un emploi limité aux laboratoires agréés pour l'utilisation de radioéléments, de nouvelles techniques sont apparues utilisant des marqueurs enzymatiques ou luminescents qui ont une réelle importance en pratique courante.

A. Principes généraux des immunodosages utilisant un marqueur

Quelle que soit la nature du marqueur utilisé (radioélément, enzyme, luminophore), on peut classer ces techniques en deux catégories : celles qui utilisent un défaut d'anticorps, encore appelées méthodes par compétition, et celles utilisant un excès d'anticorps, dont les principales sont les méthodes « sandwich » ou méthodes immunométriques à deux sites.

1. Méthodes par compétition

a) Principe

Lorsque l'on met en présence un antigène (Ag), le même antigène marqué (Ag*) et un anticorps spécifique (Ac), on observe une compétition entre Ag et Ag* vis-à-vis des sites de l'anticorps :

$$Ac + Ag + Ag^* \rightleftharpoons Ag\text{-}Ac + Ag^*\text{-}Ac$$

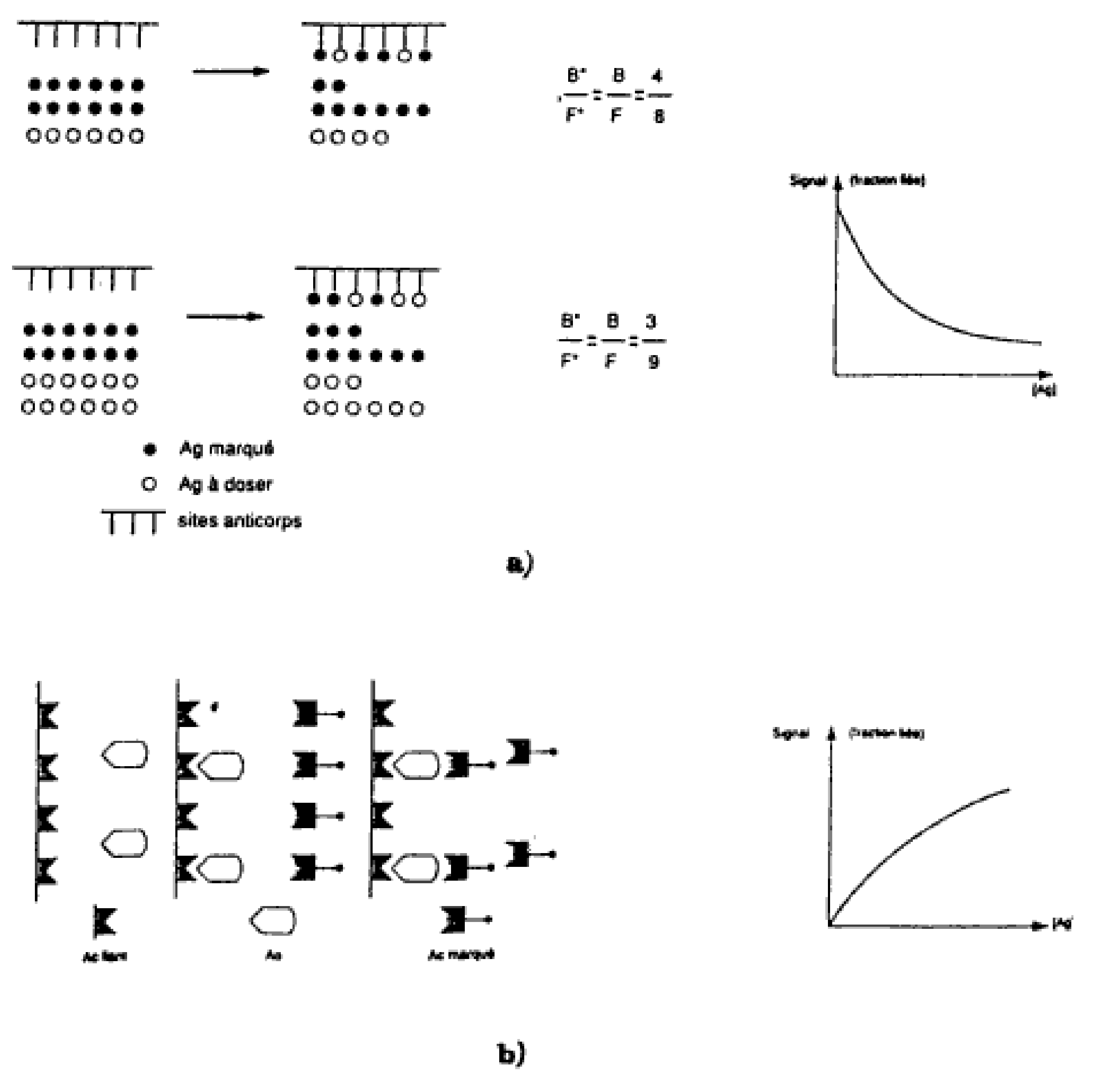


Figure 8. Principes des techniques par compétition (a) et sandwich (b)

Si l'Ag* est en concentration fixe et si l'Ac est en concentration fixe et limitée, l'augmentation de la concentration en antigène (Ag) entraîne l'augmentation de la concentration du complexe antigène-anticorps (Ag-Ac) au détriment du complexe marqué (Ag*-Ac).

Il est ainsi possible, après avoir séparé les formes libres et liées de l'antigène (respectivement Ag* = F* et Ag*-Ac = B*), de déterminer leurs concentrations grâce au signal délivré par le marqueur.

À l'équilibre, on aura pour toutes les concentrations de l'antigène :

$$\frac{B}{F} = \frac{B^*}{F^*}$$

À l'aide de différentes solutions, d'antigène, on trace une courbe donnant la concentration en antigène dans le milieu à analyser en fonction du signal obtenu. L'intensité du signal est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène à doser.

Cette technique est réalisée dans des tubes, en plaques non absorbantes, en phase liquide le plus souvent, ou en phase solide.
Différents paramètres vont conditionner la bonne qualité de la réaction :
- le volume réactionnel doit être suffisant pour conduire à un minimum d'erreurs, mais pas trop important pour éviter l'interférence de protéines étrangères à la réaction ; il varie généralement de 0,3 à 1 mL ;
- la dilution de l'antisérum : l'antisérum doit être dilué de façon à lier entre 33 % et 50 % du traceur pour une concentration nulle d'antigène ;
- la durée d'incubation : elle varie selon la nature de l'antigène (haptène ou protéine) ;
- la température : une élévation de température permet d'accélérer la réaction mais risque dans certains cas de dégrader les protéines ;
- la dilution du traceur : la dilution choisie est celle qui fournit la meilleure précision dans le domaine de concentration choisi ;
- la séparation des formes libres et liées.

b) Méthodes de séparation des formes libres et liées

Une méthode idéale de séparation devrait être simple et reproductible, efficace (la plus complète possible), rapide et si possible automatisable et peu coûteuse. Elle doit également ne pas modifier l'équilibre atteint par la réaction. En réalité, la séparation n'est jamais parfaite, notamment par l'existence de liaisons non spécifiques dues à l'entraînement d'Ag* libre dans le précipité, à la présence de contaminants de l'Ag* libre présentant des caractéristiques voisines du complexe Ag-Ac et de l'adsorption de l'Ag* libre sur les parois des tubes. Différentes techniques de séparation ont été réalisées :

■ *Méthodes physiques de séparation (techniques historiques)*

- Électrophorèse (acétate de cellulose, gel de polyacrylamide) ;
- chromatoélectrophorèse (utilisée dans la première technique de dosage de l'insuline par RIA) ;
- gel filtration sur Sephadex.

■ *Adsorption de l'Ag marqué libre*

Différents adsorbants sont utilisables : silicates (talc, silice), résines échangeuses d'anions, bentonite, charbon, cellulose. Chaque adsorbant doit être utilisé à une concentration adaptée à l'antigène concerné.

■ *Séparation chimique*

Elle est basée sur la différence de taille entre fraction libre et fraction liée. Pour une concentration donnée en agent précipitant, le complexe Ag*-Ac devient insoluble, la fraction libre restant dans le surnageant. Divers agents précipitants sont utilisés : solvants organiques (éthanol, dioxane), acide trichloracétique, sulfate d'ammonium et polyéthylène glycol (PEG 6000).

■ *Immunoprécipitation*

Les méthodes d'immunoprécipitation, encore appelées méthodes à double anticorps, consistent à précipiter le complexe Ag-Ac par une anti-immunoglobuline.

On distingue différentes variantes :

- dans la postprécipitation, le second anticorps est fixé sur le premier anticorps, au niveau de sites différents, après la fixation de l'antigène. Cette technique nécessite l'inactivation préalable des composants du système complémentaire (par chauffage ou par addition d'EDTA) et l'utilisation d'une concentration définie en second anticorps afin d'obtenir un maximum de complexe Ag-Ac dans le précipité ;
- la préprécipitation réalise une précipitation du premier et du second anticorps préalablement à l'addition de l'échantillon et de l'antigène marqué. Elle présente l'avantage d'éviter les interférences de substances contenues dans l'échantillon, mais en raison d'un encombrement stérique, l'affinité du premier anticorps pour l'antigène est diminuée ;
- la précipitation en phase solide (*Double Antibody Solid Phase ou DASP*) fait intervenir un second anticorps rendu insoluble après fixation à une phase solide (sépharose, cellulose, particules magnétiques, billes de polystyrène…). La réaction est plus rapide mais les matrices utilisées peuvent fixer l'Ag de façon non spécifique. La taille des particules et leur densité doivent par ailleurs être bien définies.

c) Avantages et inconvénients

Le principal avantage des méthodes par compétition est de s'appliquer à tous les antigènes, quelle que soit leur taille. Cependant, la sensibilité et la précision de cette technique nécessitent une constante d'affinité de l'anticorps pour l'antigène élevée, et un nombre constant de sites anticorps dans chaque tube de réaction. Ces résultats par excès peuvent être observés lorsque le milieu contient des métabolites porteurs de l'épitope. Ce manque de spécificité est évité dans les techniques immunométriques à deux sites.

2. Méthodes immunométriques à deux sites (méthodes sandwich)

a) Principe

Ces méthodes se sont considérablement développées depuis l'utilisation des anticorps monoclonaux (*fig. 8*). Elles utilisent deux anticorps ; l'un, dit « anticorps liant » utilisé en excès, et le second, marqué, comme révélateur de la réaction.

L'anticorps liant est fixé sur un support solide en quantité telle que le nombre de sites de liaison est supérieur au nombre de molécules d'antigène à doser. Les conditions de fixation des anticorps dépendent de la phase solide choisie et des anticorps. Les anticorps donnant les meilleurs résultats sont les anticorps monoclonaux. La phase solide choisie peut être en verre, nylon, polystyrène, cellulose, polyacrylamide ou sépharose ; les formes diffèrent également : billes, tubes, ailettes, plaques, particules magnétiques.

La liaison de l'anticorps à la phase solide peut être réalisée selon différents procédés :

- adsorption physique : l'adsorption a lieu par contact d'une solution tamponnée d'anticorps avec le support solide (plaques, tubes ou billes spéciaux en polystyrène ou en chlorure de polyvinyle). Les conditions opératoires varient selon chaque type de dosage ;

- couplage à une protéine préalablement fixée (albumine bovine, protéine A, avidine), dans le cas où la fixation directe de l'anticorps s'accompagne d'une perte d'affinité ;
- couplage par une réaction chimique : le polypropylène, le polyacrylamide, la cellulose et l'agarose se prêtent à des réactions chimiques. Le couplage peut être réalisé, par exemple, par un carbodiimide ou le glutaraldéhyde.

Un immunodosage de type sandwich comporte les étapes suivantes :
- une première incubation du milieu contenant la substance à doser avec l'anticorps spécifique fixé. Le temps de contact (en général compris entre 1 et 3 heures) et la température d'incubation sont variables ; la réaction peut être accélérée par une agitation. À la fin de cette étape, l'antigène est lié aux anticorps fixés sur le support solide ;
- après élimination du surnageant et plusieurs lavages, l'anticorps marqué est mis à incuber pendant une heure. L'antigène est pris en sandwich entre les deux anticorps. La séparation des formes libres et liées est faite par élimination de la phase liquide. Après de nouveaux lavages, qui permettent d'éliminer les anticorps marqués libres en excès, on procède au comptage de la radioactivité ou à la révélation des activités enzymatiques. Le plus souvent, on utilise des anticorps spécifiques différents, d'où l'intérêt des anticorps monoclonaux. Dans certains cas, le dosage peut être effectué en incubant simultanément l'échantillon et l'anticorps marqué : ce sont les méthodes dites « en un temps ». À la différence des techniques par compétition, les courbes obtenues dans les techniques immunométriques à deux sites montrent que le signal augmente proportionnellement à la concentration de l'antigène à doser.

b) Avantages et inconvénients

Cette technique présente une spécificité accrue en raison de l'utilisation d'anticorps monoclonaux, et également du fait que les anticorps sont dirigés contre deux épitopes différents de l'antigène. La limite de détection est abaissée par rapport aux techniques par compétition.

L'utilisation d'anticorps permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, et donc d'introduire une quantité plus importante de marqueurs dans la réaction ; la gamme des concentrations mesurables peut être étendue en augmentant la concentration en anticorps.

L'inconvénient majeur de ces techniques est l'existence de « l'effet crochet » qui peut apparaître avec des concentrations élevées en antigènes ; dans ce cas, on peut observer une diminution de la valeur du signal qui passe au-dessous de celle obtenue pour le dernier point de la gamme. Le résultat obtenu est alors anormalement sous-estimé. Cet effet crochet s'explique par le phénomène de zone quand l'excès d'antigène est suffisant, la majorité des sites de l'anticorps liant et de l'anticorps marqué sont occupés par des molécules d'antigène différentes.

On retrouve ce phénomène dans les méthodes en un temps (addition d'antigène et d'anticorps simultanée) et dans les méthodes en deux temps pour lesquelles il n'y a pas de lavages avant l'addition de l'anticorps marqué. Il existe différents moyens de se prémunir de ce phénomène, en diminuant la prise d'essai ou en travaillant sur deux dilutions de l'échantillon. C'est la raison pour laquelle il est indispensable de connaître la concentration en antigène au-delà de laquelle peut se manifester cet effet crochet.

B. Qualités d'un dosage immunologique

La qualité d'un dosage immunologique est définie par différents paramètres : spécificité, sensibilité, précision et reproductibilité.

Spécificité : une réaction est spécifique quand il n'y a pas d'interférence avec des substances autres que celles à doser. Dans les immunodosages, cette qualité est due en grande partie aux propriétés de l'anticorps. La spécificité peut être appréciée en vérifiant si des constituants sériques, urinaires ou tissulaires n'interfèrent pas dans la réaction. Il en est de même pour des métabolites de la substance à doser ou des molécules de structure voisines dont on peut déterminer le pourcentage de croisement.

Limite de détection : elle se rapporte à la quantité la plus faible de substance à doser détectable dans la réaction. Pour obtenir une très haute sensibilité, il est habituel d'utiliser une dilution d'antisérum qui fixe environ 500 % de la plus petite quantité d'antigène marqué, en absence de tout antigène non marqué. La dilution optimale d'anticorps, ainsi déterminée et qui sera utilisée dans le dosage, est appelée titre.

L'intérêt d'utiliser des titres élevés d'anticorps est surtout économique. Cependant, la présence de familles hétérogènes d'anticorps peut diminuer de façon importante la reproductibilité des dosages réalisés avec de trop grandes dilutions d'anticorps.

La sensibilité des immunodosages est variable. La gradation suivante peut être établie en fonction du moyen de détection :

$$EIA < FIA < RIA$$

Répétabilité : elle peut être déterminée en répétant plusieurs fois un dosage sur un même échantillon. Le coefficient de variation doit être le plus petit possible.

Reproductibilité : quand les pipettages sont précis et les conditions opératoires respectées de façon rigoureuse, la reproductibilité peut atteindre plus de 95 %. Dans les méthodes immunologiques, les dosages sont habituellement réalisés en double dans une même série pour vérifier la reproductibilité.

Pour assurer une bonne qualité du dosage immunologique, deux précautions sont à prendre.

La première concerne la nature du prélèvement : il faut veiller à ce que le sang soit recueilli dans les conditions nécessitées par le dosage (présence ou non d'anticoagulant, nature de celui-ci, addition ou non de conservateur). Le sérum est généralement conservé à 4 °C si le dosage est réalisé dans la journée, et congelé (– 20 °C ou – 70 °C) si le dosage est différé ; les congélations et décongélations successives sont à éviter. Certains sérums ou plasmas peuvent présenter un aspect anormal (hémolyse, lactescence) ; ils doivent être, dans la mesure du possible, écartés, car la réaction immunologique peut être perturbée.

La seconde précaution à prendre est l'utilisation de contrôles de qualité indispensables à la validation des séries de dosages. Ils font appel à des sérums de contrôle du commerce (présentés sous forme lyophilisée) ou à des mélanges de sérums (*pools*).

Depuis quelques années, on assiste à un développement important de l'automatisation dans le domaine des immunodosages. Il s'agit soit de semi-automates permettant de standardiser les phases délicates (pipettage, lavages, lecture) ou d'automates réalisant à partir du sérum toutes les phases de la réaction.

Le plus souvent, ils permettent d'éviter une recalibration complète (en cinq ou six points) en gardant en mémoire la courbe d'étalonnage. Ces automates sont à l'origine notamment de l'extension des techniques utilisant des marqueurs luminescents.

2. Techniques de marquage

Nous ne développerons ici que les techniques de marquage à l'iode 125, marqueur de choix en radio-immunologie.

a) Marquage d'une protéine

L'atome d'iode 125 peut être greffé directement ou par l'intermédiaire d'un ligand. Le choix est fonction de la masse moléculaire et de la structure de la protéine.

■ *Méthodes directes*

L'iodure radioactif est oxydé en I° ou I^{+} qui peuvent réagir avec les groupements phénoliques des tyrosines ou les groupements imidazoles des histidines. On distingue des méthodes chimiques et des méthodes enzymatiques. Toutes ces méthodes doivent être standardisées (pH optimal, agitation, temps et températures contrôlés).

- Méthodes chimiques. Elles consistent à faire agir un agent oxydant (chloramine T, monochlorure d'iode ou hypochlorite de sodium) en milieu liquide. L'étape d'oxydation est arrêtée grâce à l'addition d'un agent réducteur (métabisulfite de sodium ou cystéine). On peut également utiliser un agent oxydé fixé sur une phase solide (tube, bille). L'arrêt de la réaction est obtenu par récupération de la phase liquide. Divers réactifs sont proposés tels que l'Iodogen* ou l'Iodobead* ;
- Méthodes enzymatiques. La plus courante de ces méthodes utilise la lactoperoxydase en présence de peroxyde d'hydrogène. L'utilisation d'un agent réducteur n'est pas nécessaire ; la réaction est arrêtée par dilution du milieu réactionnel.

■ *Méthodes indirectes*

Elles utilisent le couplage d'une molécule iodée à la substance à marquer. Ce sont des méthodes douces (sans oxydation) qui permettent le marquage de substrats dépourvus de noyaux aromatiques. La molécule radioactive sera fixée sur un groupement phénolique ou sur un groupement aminé (méthode de Bolton et Hunter).

b) Marquage d'un haptène

■ *Méthodes directes*

Il est rare de pouvoir greffer directement un atome d'iode sur de petites molécules. Il y a cependant quelques cas particuliers :

- le marquage par addition sur des molécules possédant des doubles liaisons (acides gras insaturés) ;
- le marquage par échange isotopique pour les hormones thyroïdiennes : triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) ;
- le marquage par substitution sur le cycle A des stéroïdes.

■ *Méthode par couplage*

Dans la plupart des cas, on pratique un couplage avec un « bras » radiomarqué. Les composés utilisés sont la tyrosine méthyl ester ou TME, la tyramine et l'histamine.

c) Purification du traceur

Après chaque marquage, une étape de purification est nécessaire pour éliminer les contaminants tels que les réactifs en excès, les produits de dégradation, le substrat

non marqué. Cette purification a pour but d'augmenter la stabilité du traceur et de diminuer la liaison non spécifique.
Différentes méthodes peuvent être utilisées :
- électrophorèse sur acétate de cellulose ;
- gel filtration ;
- chromatographie d'échange d'ions ;
- chromatographie en couche mince (utilisée pour les petites molécules), chromatographie d'affinité ;
- chromatographie liquide haute pression (CLHP) (méthode la plus performante).

3. Qualité du traceur et de l'appareillage

Les performances du dosage dépendent énormément de la qualité du traceur. Il doit différer le moins possible du ligand pur. L'immunoréactivité du traceur doit être vérifiée en comparant la courbe de déplacement obtenue par addition de concentrations croissantes en protéine à celle obtenue après addition de concentrations croissantes du traceur.
Son activité spécifique doit être élevée afin d'accroître la sensibilité de la réaction.
La stabilité d'un traceur est très variable. Elle peut être augmentée par addition de protéine, congélation ou lyophilisation et conservation sous atmosphère inerte ou en solvant organique.
Le matériel de mesure doit être contrôlé en déterminant la mesure du bruit de fond et le rendement de comptage. Le bruit de fond correspond au taux de comptage d'un détecteur en l'absence d'échantillon ; il doit être déduit de chaque mesure. Ce bruit de fond est lié à l'existence d'impulsions parasites (électronique, radioactivité ambiante, rayonnement cosmique). Il doit être contrôlé régulièrement pour détecter une éventuelle contamination ou une défaillance électronique.
Les résultats d'un comptage sont exprimés en impulsions par minute. Il est possible, en connaissant le rendement du compteur, de les rendre en désintégrations par minute. Ce rendement tient compte de l'efficacité du détecteur et de la position de la source. Il est voisin de 80 % pour le ^{125}I et de 60 % pour le ^{3}H.

4. Méthodes de dosage

Les radio-immunodosages peuvent être classés en deux groupes :
- les dosages radio-immunologiques classiques (RIA), fondés sur le principe de la compétition entre l'antigène à doser et un antigène radiomarqué vis-à-vis d'un anticorps spécifique. Ils sont adaptés au dosage de petites molécules ;
- les dosages immunoradiométriques (IRMA) regroupent un ensemble de techniques dont la variante habituelle est la méthode « sandwich ». Elles permettent surtout le dosage de plus grosses molécules, sont plus sensibles que la méthode par compétition et permettent d'utiliser une gamme plus large d'étalonnage.

  Les principes de ces deux techniques ont été étudiés dans la première partie. Les méthodes de dosage avec marqueurs radioactifs sont très compétitives en raison de leur spécificité, leur sensibilité et leur fiabilité de mise en œuvre. Cependant, elles comportent de nombreuses contraintes : autorisation d'utilisation de radioéléments, radioprotection.

En ce qui concerne les haptènes, chaque cas est particulier. Dans les couplages enzyme-protéines, les groupements fonctionnels utilisés sont les amines primaires et les carboxyles terminaux, les thiols (après réduction des ponts disulfures) et les résidus glucidiques pour les glycoprotéines. La liaison est réalisée grâce à un agent coupleur qui est un réactif bifonctionnel.
On distingue deux types de procédés :
- les techniques en un temps : enzyme, protéine et agent coupleur sont mélangés, il est difficile dans ce cas d'extraire un traceur purifié ;
- les techniques en deux temps : l'agent coupleur réagit avec l'enzyme ou la protéine à couper qui sont dites activées ; l'excès d'agent coupleur est éliminé avant de mettre le composé activé en contact avec son complément ; ce procédé est plus complexe mais donne des traceurs de meilleure qualité.

a) Différentes méthodes de couplage

- Couplage au moyen du glutaraldéhyde : les fonctions aldéhydes du glutaraldéhyde réagissent avec les groupements aminés de l'enzyme et des protéines pour donner un pont stable. La réaction fait intervenir la création de bases de Schiff ; c'est une méthode largement utilisée ;
- Couplage au moyen du périodate : le périodate de sodium oxyde des groupements hydroxyles de résidus glucidiques d'une glycoprotéine en aldéhydes ; ceux-ci réagissent dans un deuxième temps avec les groupements aminés d'une protéine pour former des bases de Schiff qui sont stabilisées par le borohydrure de sodium. C'est une méthode en deux temps, utilisée pour lier la peroxydase, riche en sucres, à des immunoglobulines ;
- Couplage au moyen de dimaléimides : cette technique nécessite l'existence d'une fonction sulfhydryle sur les protéines à couper ; celle-ci peut être créée par réduction de ponts disulfures par la mercaptoéthylamine. Ce procédé est utilisé dans le couplage de la galactosidase (qui comporte des groupements sulfhydriles liables à des immunoglobulines) ;
- Couplage au moyen de la benzoquinone : cette réaction fait intervenir principalement les groupements aminés et sulfhydriles des protéines ;
- Couplage au moyen de maléimide ester : un dérivé maléimide est lié à une enzyme par une fonction amine dans un deuxième temps, une fonction sulfhydryle d'une immunoglobuline réagit avec le nouveau maléimide ;
- Couplage au moyen du système avidine-biotine : l'affinité entre l'avidine et la biotine est mise à profit pour lier indirectement une immunoglobuline et une enzyme.

Deux procédés peuvent être utilisés :
- dans le premier, l'immunoglobuline et l'enzyme sont coupées séparément avec de la biotine, puis leur liaison est assurée par de l'avidine qui fixe 4 molécules de biotine ;
- dans le second, l'immunoglobuline est biotinylée puis mise en contact avec un conjugué avidine-enzyme et la liaison s'établit spontanément.

Pour réduire les liaisons non spécifiques du traceur, on peut utiliser la streptavidine à la place de l'avidine. L'intérêt du système avidine-biotine tient au fait qu'il permet une amplification du signal par liaisons multiples d'enzyme à une immunoglobuline.

b) Purification des conjugués

Chaque étape du couplage doit être suivie d'une étape de purification, ce qui permet :

- l'élimination de l'excès d'agent coupleur (dialyse, filtration sur gel) ;
- la séparation du conjugué enzyme-immunoglobuline et des molécules n'ayant pas réagi (filtration sur gel).

La conservation des conjugués se fait à basse température (– 70 °C).

3. Méthodes de dosage

L'activité d'un marqueur enzymatique peut varier selon que le traceur est impliqué ou non dans le complexe antigène-anticorps. Cette variation est mise à profit dans les méthodes dites en phase homogène. Les méthodes qui nécessitent une séparation des complexes sont appelées méthodes en phase hétérogène.

a) Méthodes en phase homogène

Ce sont, pour la plupart, des méthodes par compétition. La principale est la méthode EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Test*). Ce type de dosage est basé sur le principe de l'inhibition ou de l'activation de l'activité enzymatique lors de la fixation de l'antigène marqué (conjugué) sur le site anticorps. Ces modifications sont dues à des transformations de la conformation moléculaire de l'enzyme (*fig. 9*). Le dosage est direct, souvent cinétique, et ne nécessite pas de séparation des différentes formes ; il est de plus rapide et automatisable mais s'applique principalement au dosage de petites molécules (hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, médicaments). Les enzymes les plus utilisées sont la malicodéshydrogénase (MDH), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et le lysozyme. En raison des faibles différences d'absorbance, ces tests en phase homogène sont nettement moins sensibles que les tests en phase hétérogène ou que les tests radio-immunologiques.

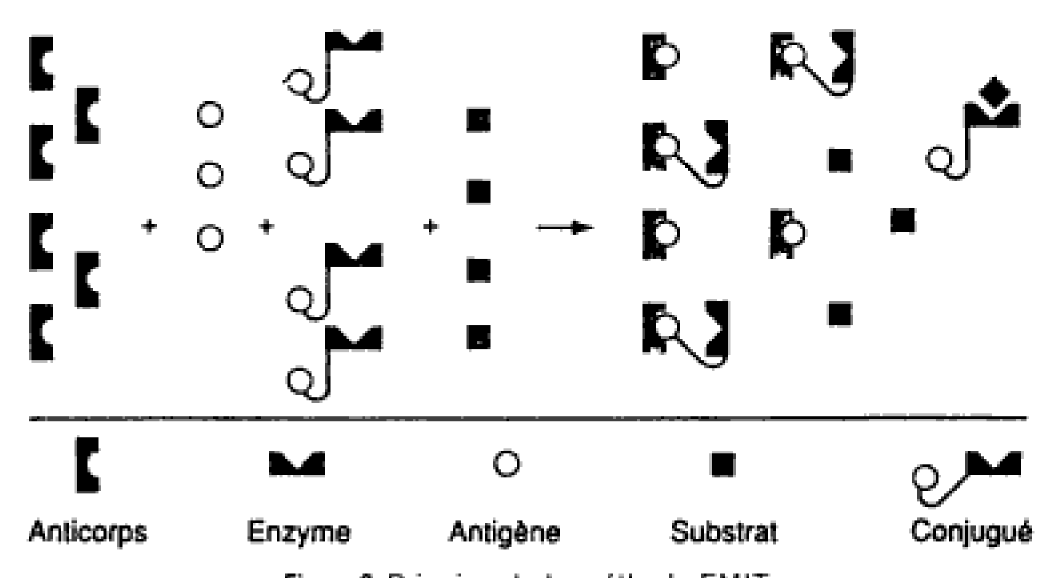


Figure 9. Principe de la méthode EMIT

b) Méthodes en phase hétérogène

Parmi les méthodes en phase hétérogène, les plus courantes sont les méthodes Elisa (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*). Celles-ci regroupent des méthodes par compétition (Elisa compétition) et des méthodes immunométriques (Elisa sandwich).

Cette technique est surtout utilisée pour le dosage d'anticorps en virologie ou en parasitologie.

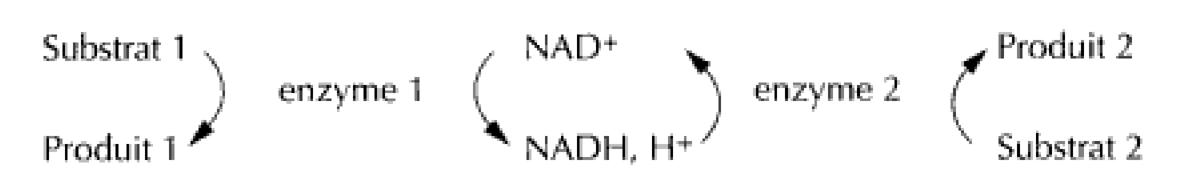
■ ***Méthodes double sandwich***

Dans ces techniques, c'est un premier anticorps qui est fixé, mais au lieu d'utiliser un second anticorps marqué (coûteux), on emploie un second anticorps non marqué qui sera révélé à son tour par un anticorps antiglobuline marqué.
Ce dernier peut être utilisé pour n'importe quelle réaction.

c) Amplification enzymatique

L'amplification enzymatique permet d'améliorer le signal obtenu par les méthodes immunoenzymatiques.
Différents procédés peuvent être utilisés :

- le système avidine-biotine qui permet de fixer plusieurs molécules d'enzymes ;
- l'amplification par recyclage du coenzyme : deux enzymes utilisant le NAD^+ comme coenzyme produisent, en présence des substrats correspondants, un cycle d'oxydoréduction qui conduit à une accumulation des produits de l'action des deux enzymes :



Elle se déroule en trois étapes :

- formation du NADH, H^+ ;
- destruction de l'excès de NAD^+ ;
- dosage du produit accumulé.

Ce procédé présente cependant des inconvénients : le protocole est complexe, la sensibilité est limitée par les contaminations et la limite de détection n'est pas améliorée dans les mêmes proportions que le signal, en raison de l'augmentation du bruit de fond.

- L'amplification par recyclage du substrat : cette technique est utilisée pour le dosage des œstrogènes et de certains androgènes. Elle utilise l'activité de trans-hydrogénation de l'œstradiol déshydrogénase ;
- L'amplification par l'utilisation de marqueurs luminescents – les techniques seront abordées dans la partie suivante (immunodosage utilisant un marqueur luminescent).

d) Cas particulier du dosage des haptènes

Diverses techniques de type sandwich permettent de doser des haptènes de faible masse moléculaire, compensant ainsi le caractère monoépitopique de ces molécules. Dans la méthode d'Ishikawa, l'haptène est modifié avant le dosage par une molécule de biotine. L'haptène biotinylé est alors capturé sur une phase solide contenant un anticorps spécifique, il est ensuite incubé avec un anticorps anti-haptène marqué et transféré sur une phase solide contenant de l'avidine ; le signal fixé sur la phase solide est ensuite mesuré.

Certains anticorps (dénommés anticorps antimétatypes) ont la propriété de reconnaître un complexe antigène-anticorps alors qu'ils n'ont que peu ou pas d'affinité pour l'anticorps ou l'antigène. On va utiliser un anticorps monoclonal anti-haptène comme anticorps de capture, et un anticorps antimétatype qui reconnaîtra spécifiquement le complexe haptène-anticorps.

On peut également utiliser des anticorps anti-idiotypes pour réaliser des dosages de type sandwich.

Dans une première étape, l'haptène réagit avec un anticorps spécifique, lui-même marqué de façon indirecte par un anticorps anti-isotype couplé à une enzyme. Dans les deux étapes suivantes interviennent deux anticorps anti-idiotypes différents : le premier dont la liaison est incompatible avec celle de l'haptène, le second dont la liaison est compatible avec celle de l'haptène. Ce second anticorps anti-idiotype est alors immobilisé sur la phase solide.

Dans la technique SPIE-IA (*Solid Phase Immobilized Epitope Immunoassay*), l'haptène est, dans un premier temps, capturé sur un support solide par l'intermédiaire d'un anticorps spécifique. Après lavage, l'haptène est immobilisé de façon covalente sur les protéines de la phase solide. Il est ensuite libéré du site de liaison de l'anticorps, qui est lui-même inactivé.

Dans une dernière étape, l'haptène est révélé par le même anticorps marqué.

E. Techniques utilisant un marqueur luminescent

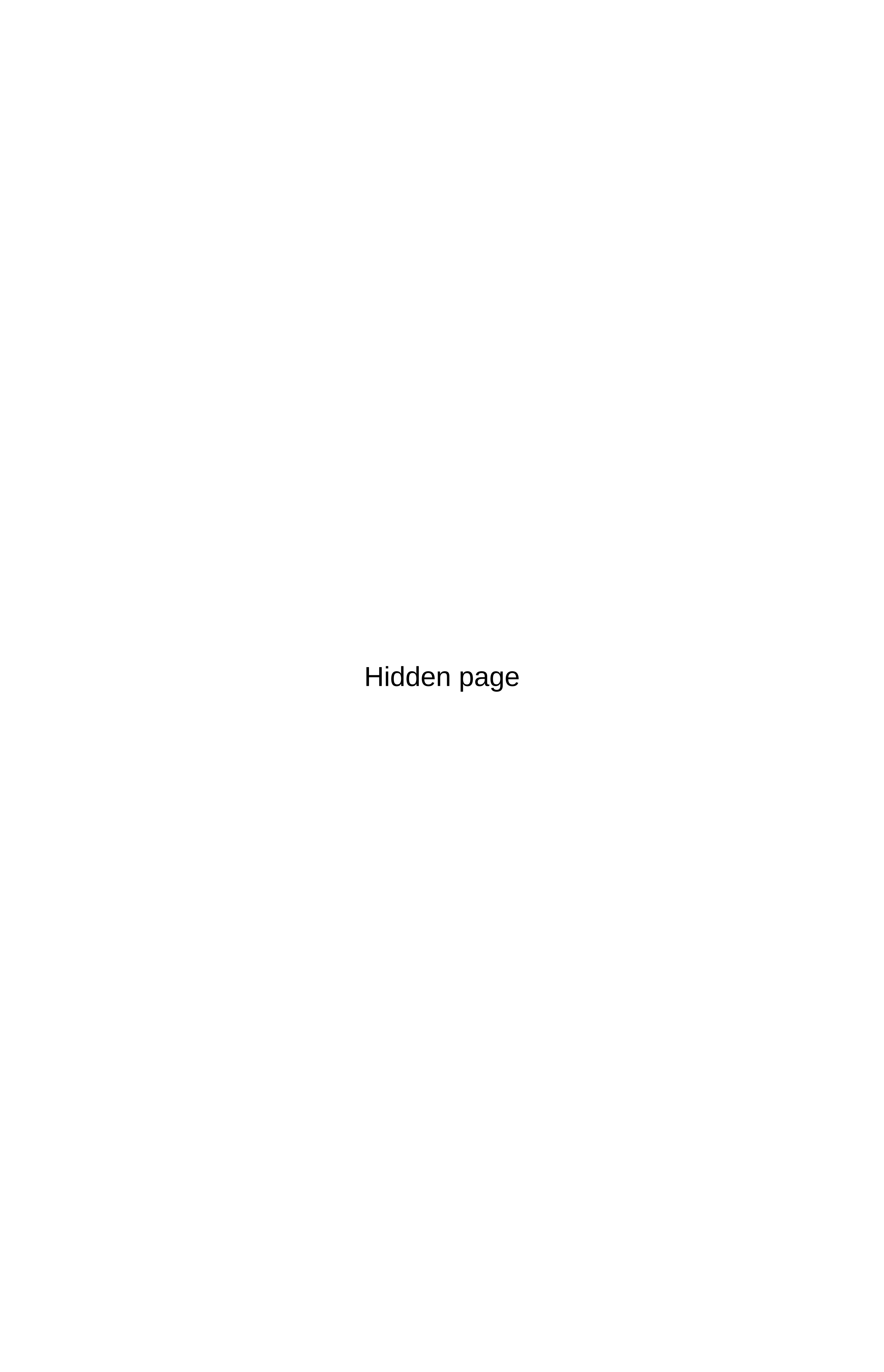
Ces méthodes se sont développées ces dernières années en raison de l'apparition de différents marqueurs et du perfectionnement des appareils de mesure. À la différence du marqueur radioactif, le marqueur luminescent émet un signal provoqué par un apport d'énergie extérieure. On distingue les techniques par compétition (*Luminescence immunoassay*, LIA) et les techniques immunométriques (*immunoluminometric assay*, ILMA).

1. Généralités sur les phénomènes de luminescence moléculaire

Une molécule qui absorbe suffisamment d'énergie pour passer à un niveau d'énergie (électronique, vibrationnelle, rotationnelle) supérieur (état excité) retourne à son niveau d'énergie fondamental. Ce retour peut se faire avec émission de photons ; c'est le phénomène de luminescence. En immunoanalyse, différents types de luminescence sont utilisés, qui se distinguent par la nature de l'énergie d'excitation et le mode de désexcitation.

Tableau 2. Différents types de luminescences

Énergie d'excitation	Type d'émission
Lumineuse	Photoluminescence $S^* \rightarrow S_0$ Fluorescence $T^* \rightarrow S_0$ Phosphorescence
Chimique – Cas général d'une réaction chimique – Cas particulier de l'intervention d'un système enzymatique	Chimiluminescence $S^* \rightarrow S_0$ Chimiluminescence $S^* \rightarrow S_0$ Bioluminescence



b) Le phénomène de quenching

Les photons de fluorescence peuvent être absorbés par des molécules environnantes. Ce phénomène contribue à affaiblir l'intensité de fluorescence. Il est lié à la composition du milieu.
La *chimiluminescence* est un phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique portant une molécule dans un état excité. Elle est caractérisée pour une espèce moléculaire par un spectre d'émission. La bioluminescence est un cas particulier de chimiluminescence qui nécessite l'intervention de réactions enzymatiques. En chimiluminescence et en bioluminescence, l'émission de lumière commence immédiatement après le début de la réaction chimique.
L'intensité de l'émission augmente rapidement jusqu'à un maximum puis diminue pour s'annuler en quelques dizaines de secondes. Comme dans le cas de la photoluminescence, l'émission lumineuse peut être perturbée par des phénomènes de quenching.

2. Les marqueurs luminescents

a) Marqueurs fluorescents

Les fluorophores classiques tels que fluorescéine, rhodamine, isothiocyanates de fluorescéine et de rhodamine, ANS, 4-méthyl, ombelliférone, ont un temps de déclin de fluorescence faible (< 16 ns), un déplacement de Stokes inférieur à 100 nm et une longueur d'onde d'émission inférieure à 600 nm.
D'autres fluorophores, plus récemment utilisés, présentent une qualité supérieure, c'est le cas des phycobiliprotéines et des porphyrines (de rendement quantique élevé) et surtout des chélates de lanthanides (Europium, Terbium, Samarium) dont la constante de déclin de fluorescence est élevée (10 à 1 000 µs).

Tableau 3. Fluorophores.

Fluorophore	l max (abs) (nm)	l max (ém.) (nm)	Rendement quantique	τ(ns)
Isothiocyanate de fluorescéine	492	520	0,85	4,5
Isothiocyanate de rhodamine	550	585	0,7	3
ANS	385	471	0,8	16
4-méthyl-ombelliférone	364	448	0,69	
Chélates de lanthanides	340	613	≈ 1	10 à 1 000 µs

b) Les marqueurs chimiluminescents et bioluminescents

À la différence des marqueurs fluorescents, leur signal est très spécifique car ne nécessitant pas de lumière excitatrice ; le seul problème est celui de leur reproductibilité du fait de la variation de l'intensité lumineuse pendant la réaction chimique.
Les marqueurs chimiluminescents les plus utilisés sont le luminol, l'isoluminol et leurs dérivés. En présence de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase, ils sont transformés en espèces excitées qui retournent à l'état fondamental avec émission de photons. Le maximum d'émission est observé à 430 nm. Les esters d'acridium ne nécessitent pas de peroxydase. Ils sont moins sensibles à l'oxydation que le luminol mais ne peuvent marquer que des grosses molécules.

■ *Fluoro-immunodosages en phase homogène*

Les fluoro-immunodosages en phase homogène sont des méthodes par compétition qui reposent sur le fait que le signal fluorescent émis est différent selon que l'antigène marqué est libre ou lié à l'anticorps. Elles présentent l'avantage des méthodes en phase homogène, mais utilisent des fluorophores classiques dont le signal est peu spécifique.

• Polarisation de fluorescence

Le taux de polarisation d'un antigène de faible masse moléculaire (ou d'un haptène), marqué par une sonde fluorescente et libre en solution, est faible : l'antigène, de faible volume moléculaire, tourne rapidement sur lui-même en raison des mouvements browniens ; sa lumière de fluorescence sera très dépolarisée.

Au contraire, si l'antigène est lié à l'anticorps correspondant, son mouvement sera très ralenti et le taux de polarisation du complexe antigène-anticorps sera élevé. Lorsque l'on ajoute, à des concentrations fixées d'antigène marqué et d'anticorps, des doses croissantes d'antigène non marqué, on observe une diminution de la polarisation de fluorescence traduisant la compétition entre antigène marqué et antigène non marqué pour l'anticorps. Une courbe de calibration réalisée à l'aide d'une gamme d'antigène permet de déterminer la concentration d'un antigène en fonction du taux de polarisation obtenu.

• Extinction de fluorescence en milieu homogène

Dans cette technique, après compétition entre Ag* et Ag non marqué vis-à-vis des sites de fixation de l'anticorps, la fluorescence émise par l'Ag lié à l'anticorps est quenchée par un phénomène de transfert d'énergie sur la molécule d'anticorps. L'intensité de fluorescence augmente donc en fonction de la concentration en antigène à doser (*fig. 12a*).

L'importance du quenching de fluorescence dû à l'anticorps est faible et la technique peu sensible ; c'est la raison pour laquelle une amélioration a été proposée.

• Fluoro-immunodosages utilisant le phénomène de transfert d'énergie FETI (*Fluorescence excitation transfert immunoassay*)

Le phénomène de quenching de fluorescence est augmenté par la liaison de composés accepteurs d'énergie sur les molécules d'anticorps (*fig. 12b*) telles que la rhodamine. Le transfert d'énergie se fait de la fluorescéine vers la rhodamine qui capte l'énergie d'excitation sans émission de lumière.

• Fluoro-immunodosages utilisant la protection de fluorescence

Deux préparations différentes d'anticorps sont utilisées :
- une première dirigée contre l'antigène ou l'haptène à doser ;
- la seconde contre la molécule de fluorochrome.

La réaction se déroule en deux temps :
- dans la première étape, l'antigène marqué est incubé en présence de l'antigène à doser et de l'anticorps ;
- dans la seconde étape, l'anticorps antifluorochrome est ajouté au milieu ; sa fixation sur le fluorochrome entraîne un quenching de fluorescence dont l'importance est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène à doser (*fig. 12c*). Le quenching de fluorescence peut être augmenté par le couplage d'un dérivé de la rhodamine sur l'anticorps antifluorochrome.

par une réaction de chimiluminescence, en dosant le produit accumulé lors de la réaction enzymatique ; dans ce cas, la sensibilité est augmentée par l'utilisation de la luminescence car le dosage utilise à la fois la réaction de luminescence, et l'amplification enzymatique. L'inconvénient de ces dosages est la fugacité et l'instabilité du signal.

■ *Méthodes utilisant les réactions de bioluminescence*

Les réactions de bioluminescence peuvent être mises à profit dans les dosages immunoenzymatiques. Les luciférases, utilisées en tant que révélateurs de la formation d'ATP ou de NADH, permettent une détection d'activité enzymatique parmi les plus sensibles des techniques de détection existantes. Les deux groupes de techniques immunoenzymatiques (en phase homogène et en phase hétérogène) peuvent être améliorés par l'introduction de la bioluminescence. Le marqueur utilisé est une enzyme produisant soit de l'ATP, soit du NADH.

Après accumulation des produits de la réaction, ceux-ci sont dosés par bioluminescence grâce aux enzymes de luciole (pour l'ATP), ou de bactéries marines (pour le NADH). Si un dosage en phase hétérogène de type Elisa est possible, ce sont cependant les techniques en phase homogène qui sont les plus séduisantes car automatisables.

Les immunodosages utilisant des marqueurs luminescents sont de plus en plus employés en pratique courante. Parmi les méthodes par compétition, celles qui utilisent les chélates de lanthanides et les molécules chimiluminescentes sont de qualités voisines des techniques radio-immunologiques. Les immunodosages par polarisation sont réservés aux molécules de petite masse moléculaire (< 10 000). Leur limite de détection n'est pas suffisante pour de nombreuses molécules. Parmi les techniques immunométriques, les immunodosages utilisant des marqueurs luminescents présentent des critères de qualités équivalents aux techniques immunoradiométriques, avec l'avantage de ne pas utiliser de marqueurs radioactifs.

4. Techniques d'immunofluorescence qualitative

a) Principe

Cette méthode mise au point par Coons permet de mettre en évidence des réactions antigènes-anticorps difficiles à visualiser par les techniques habituelles, en particulier lorsqu'il s'agit de rechercher un antigène ou un anticorps sur une préparation microscopique de tissu, de fragment d'organe ou d'exsudat. Les immunoglobulines peuvent être conjuguées à un composé fluorescent sans perdre leurs propriétés spécifiques. On peut ainsi les repérer facilement en les soumettant à un éclairage ultraviolet : la substance fluorescente émet alors un rayonnement secondaire dans le spectre du visible, rayonnement qui peut donc être facilement repéré par vision directe ou photographie.

Le marquage des globulines anticorps se fait par incubation pendant plusieurs heures, en milieu salin, avec des colorants fluorescents tels que :
- l'isothiocyanate de fluorescéine (vert) ;
- le chlorure de rhodamine (rouge orange) ;
- le chlorure d'am inonaphtaline sulfonyl (jaune).

Le repérage se fait grâce à une installation microscopique qui comporte :
- une source de lumière ultraviolette, représentée par un arc à vapeur de mercure ;

préalable fixé sur un antigène figuré ou tissulaire. Les zones ou points qui apparaissent fluorescents après application de l'antiglobuline fluorescente permettent de repérer ou de localiser les anticorps fixés au préalable sur l'antigène correspondant.

- La méthode sandwich consiste à localiser un anticorps, notamment dans une cellule, en appliquant d'abord sur la préparation un excès d'antigènes qui se fixent sur les anticorps correspondants en gardant des sites antigéniques libres. Dans un second temps, des anticorps fluorescents se fixeront sur ces sites restés libres. L'antigène est donc pris en sandwich entre l'anticorps recherché et un anticorps fluorescent de même spécificité.
- L'utilisation d'un anticomplément fluorescent permet également de rechercher dans un sérum un anticorps fixant le complément. Dans un premier temps, la préparation qui comporte l'antigène est recouverte du sérum à étudier et de complément. S'il existe dans le sérum des anticorps fixant le complément, ce dernier sera visualisé par l'anticomplément fluorescent.

c) Applications

La méthode directe est utilisée dans le but de déceler ou de localiser un antigène figuré ou non dans un prélèvement ou un tissu.

Elle peut être appliquée en histochimie pour localiser une hormone dans un tissu endocrinien : insuline dans les cellules bêta des îlots de Langerhans, hormone somatotrope dans les cellules éosinophiles de l'antéhypophyse, etc.

Grâce à des anti-immunoglobulines, elle peut caractériser un type donné d'immunoglobulines au sein d'un tissu lymphoïde, ou mettre en évidence des anticorps ou le complément au sein d'un tissu altéré par un processus auto-immun. En virologie, elle a permis de localiser certains virus, soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau des cellules infectées. Mais l'application la plus courante est l'identification rapide et sans nécessité de culture d'une bactérie ou d'un parasite dans un prélèvement par l'emploi d'un antisérum fluorescent spécifique. Il est notamment ainsi possible de détecter des Chlamydiæ à l'examen direct d'un prélèvement vaginal ou de typer avec précision des colibacilles par des antisérums spécifiques.

Les méthodes indirectes permettent, selon diverses modalités, la recherche d'anticorps circulants ou tissulaires.

Pour le diagnostic de la syphilis, un étalement de culture de tréponèmes pathogènes, souche Nichols, sur une lame sèche, est mis en présence du sérum à étudier, puis d'un antisérum humain fluorescent. Si le sérum contient des anticorps, ils tapissent les tréponèmes et fixent secondairement les antiglobulines fluorescentes. Les tréponèmes apparaissent alors fluorescents sur le fond noir de la préparation. Cette réaction est rendue semi-quantitative en utilisant des dilutions successives du sérum. Les anticorps décelés par cette méthode sont distincts des réagines syphilitiques et des immobilisines du test de Nelson. Ils ont l'intérêt d'être les plus précoces à apparaître lors de la syphilis primo-secondaire.

Une méthode analogue est appliquée au diagnostic de la toxoplasmose mais le plus souvent, elle est couplée à une technique d'inhibition. Le sérum à examiner est appliqué dans un premier temps sur une préparation contenant des toxoplasmes. Dans un second temps, la préparation est mise en contact avec un immunsérum antitoxoplasme fluorescent. Le résultat est positif s'il y a inhibition de la fluorescence spécifique de toxoplasmes déjà saturés par fixation des anticorps du sérum étudié.

F. Techniques multiples simultanées

Ces techniques, de développement récent, permettent de réaliser, au sein d'une même matrice chimique réactionnelle, la quantification de plusieurs analytes à partir d'une seule prise d'échantillon biologique, et ceci en une suite unique et réduite d'étapes analytiques. Selon le nombre de ligands impliqués, le nombre et le type de signaux émis, on distingue actuellement trois principaux types de méthodes.

1. Techniques associant plusieurs sites réactionnels et un type de signal à caractéristiques variables

Chacun des anticorps forme avec leurs analytes et leurs conjugués respectifs des complexes différents qui conduisent à l'émission de signaux d'un type unique (électromagnétique, fluorescent…) mais de caractéristiques différentes (énergie, longueur d'onde…).
Cette technique est essentiellement développée en RIA et ne permet guère plus de deux dosages simultanés. Des techniques mettant en jeu des chélates de lanthanides permettent, grâce à des mesures de fluorescence en résolution temporelle, la quantification simultanée de deux ou trois analytes différents. Toutes ont pour base l'Europium associé au Samarium et/ou au Terbium. Des techniques utilisant quatre chélates (les précédents et le Dyprosium) sont en cours de développement.
Les applications sont peu nombreuses : bilan thyroïdien (T4 libre/TSH), fertilité (LH/FSH), anémie (folates/vitamine B12), marqueurs tumoraux (AFP/HCG).

2. Techniques associant plusieurs sites réactionnels et un type de signal à caractéristiques fixes

Elles reposent sur l'utilisation d'une phase solide unique sur laquelle des ligands sont déposés ou fixés en des sites réactionnels parfaitement localisés. Pour un ensemble de dosages donnés, le traceur reste le même (radioélément, enzyme, composé fluorescent ou luminescent) et ses caractères physiques ne varient pas.
Ces techniques sont automatisables et se prêtent à différentes applications :
- détection de profils anticorps (allergie, maladies auto-immunes) ;
- détection d'IgE spécifiques ;
- maladies infectieuses ;
- détection simultanée des marqueurs sériques (antigènes et anticorps) (hépatites, HIV) ;
- détection différentielle et simultanée des micro-organismes pathogènes sur la base de leur génome (maladies sexuellement transmissibles).

3. Techniques associant plusieurs sites réactionnels et plusieurs types de signaux différents

Ces techniques en sont encore au stade de la recherche fondamentale. La maîtrise de nouveaux types de signaux est une condition nécessaire à leur développement.

le dosage de protéines spécifiques. Les réactions de précipitation en milieu gélifié peuvent être qualitatives (immunoélectrophorèse et immunofixation utilisées dans le diagnostic des dysglobulinémies) ou quantitatives (immunodiffusion radiale, immunodiffusion double ou technique de Mancini, immunoélectrophorèse bidimensionnelle).
Les réactions utilisant un marqueur peuvent être classées en deux catégories :

- celles qui utilisent un défaut d'anticorps, dites méthodes par compétition, présentent l'avantage de s'appliquer à tous les antigènes quelle que soit leur taille, mais manquent de spécificité ;
- celles utilisant un excès d'anticorps, dont les principales sont les méthodes immunométriques à deux sites ou « méthodes sandwich », sont plus spécifiques ; l'inconvénient de ces techniques est l'existence de « l'effet crochet » qui peut apparaître avec des concentrations élevées en antigène.

Différents marqueurs peuvent être utilisés :

- un radio-isotope (^{125}I, le plus souvent) dans les techniques radio-immunologiques ;
- une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase...) dans les enzymo-immunodosages : l'enzyme est le marqueur de l'antigène ou de l'anticorps qui permet la quantification de la réaction en présence d'un substrat approprié. On distingue les méthodes en phase homogène (EMIT) et celles en phase hétérogène (Elisa compétition, Elisa sandwich) ;
- un marqueur luminescent : celui-ci émet un signal provoqué par un apport d'énergie extérieure. On distingue les techniques par compétition (LIA : *luminescence immunoassay*) et les techniques immunométriques (ILMA : *immunoluminometric assay*).

Les techniques utilisant un marqueur radioactif, enzymatique ou luminescent permettent la détection et la quantification de substances présentes à l'état de traces dans les liquides biologiques.

Pour en savoir plus

- Immunoanalyse et biologie spécialisée. Elsevier.
- Revue Immunoanalyse et Biologie Spécialisée (IBS), traitant de l'actualité en immunoanalyse, (6 numéros par an), Elsevier.

Méthodes de mesure des activités enzymatiques

P. LALÉGERIE, Laboratoire de biochimie, UFR de pharmacie, Poitiers.
B. BAUDIN, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris et UFR de pharmacie, Châtenay-Malabry (Paris XI).


Hidden page


Hidden page

solubilité du substrat et l'absorbance propre du substrat en spectrophotométrie (linéarité du spectrophotomètre).

B. Faut-il étalonner ?

On remarquera que si la valeur de K_{cat} est connue (équation 3), il est tout à fait possible de connaître la concentration en enzyme. Toutefois, K_{cat} dépend des conditions opératoires (température, effecteurs) ; elle n'est donc utilisable que pour une méthode donnée qui sera étalonnée avec une enzyme très purifiée.
En pratique courante, cette façon d'opérer n'est pas retenue parce que dans le sérum sont présents simultanément des isoenzymes en concentration variable selon la pathologie. Ces isoenzymes présentent des K_{cat} et des Km assez différents ; on mesure donc une vitesse qui correspond à une *activité globale* des isoenzymes présentes.

C. Nature du substrat

Si la spécificité de l'enzyme est large, c'est-à-dire si elle tolère plusieurs substrats, la vitesse de la réaction est généralement caractéristique d'un substrat donné. *Dans ce cas assez répandu, l'expression des résultats de la mesure d'une activité enzymatique dépendra au premier chef de la nature du substrat choisi*, ce qui n'apparaît pas dans la définition des unités internationales qui est une simple expression de la vitesse de la réaction. Le choix du substrat idéal est en fait un compromis entre la spécificité de ce substrat pour l'enzyme (qui est garante de l'exactitude des mesures) et les contraintes analytiques liées à la sensibilité et à la praticabilité des mesures. Pour atteindre ce dernier but, on choisira le substrat qui est transformé à la vitesse la plus élevée et qui génère des produits facilement mesurables.
Les phosphatases, par exemple, présentent une faible spécificité. Les phosphomonoestérases, comme leur nom l'indique, sont spécifiques de la fonction monoester. Elles catalysent aussi bien l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate, produit de synthèse, que l'hydrolyse des glycérophosphates naturels.

D. Signification de Vm : unités utilisées en enzymologie

La vitesse maximum de la réaction ne représente pas par elle-même une quantité d'enzyme mais cette vitesse est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme (cf. équation 3).

1. Unité enzymatique

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une certaine quantité de substrat par unité de temps.
Deux types d'unités sont actuellement utilisés, qui correspondent à deux modes d'expression de la Vm :

- l'*unité internationale (UI)*, qui n'est pas cohérente, correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ;

- le *katal (kat)*, cohérent, correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde (les sous-multiples sont seuls utilisés : millikatal, microkatal et nanokatal).

Le passage d'une unité à l'autre s'effectue aisément de la façon suivante :

1 UI = 1 μmol.min^{-1} = 10^{-6}/60 mol.sec^{-1} = 10^{-6}/60 kat = 0,01667 μkat = 16,67 nkat

2. Concentration d'enzyme dans un milieu biologique et activité spécifique

a) Concentration

La vitesse de la réaction enzymatique étant assimilée à la quantité d'enzyme, il est possible de parler de concentration d'activité catalytique soit en unités internationales par litre (UI/L) soit en katals par litre (kat/L).

b) Activité spécifique

Les unités dérivées sont : la quantité d'activité catalytique spécifique (UI/kg ou kat/kg) et la quantité d'activité catalytique molaire (UI/mol ou kat/mol).

c) Remarque importante

La comparaison de résultats exprimés en UI/L n'est possible en enzymologie clinique que dans le cas où les conditions opératoires sont dûment précisées (nature du substrat, température, etc.).

II. Effecteurs de la réaction enzymatique

A. pH

Notons que l'effet du pH est complexe puisqu'il agit à la fois :

- *sur l'équilibre de la réaction* si celle-ci implique la libération ou la capture d'un proton (cas des coenzymes nicotinamide-dinucléotide NAD) :

$$NAD^+ \rightleftharpoons NADH + H^+$$

- *sur la conformation de la protéine enzyme et l'ionisation des groupes impliqués dans la catalyse au niveau du site actif de l'enzyme.*

Toutefois, il y a toujours un pH optimum pour lequel l'effet catalytique de la protéine enzyme est maximum.

Pour certaines enzymes, de petites variations du pH provoquent des grandes variations de l'activité. Pour d'autres enzymes au contraire, l'effet du pH est moindre. L'ensemble de ces contraintes exige que le milieu réactionnel soit rigoureusement tamponné. De façon générale, c'est le pH optimum qui est choisi ; il est pour la plupart des enzymes proche de la neutralité. Toutefois, si le pH est le seul paramètre qui permette de séparer deux isoenzymes, des pH alcalins ou acides sont utilisés.

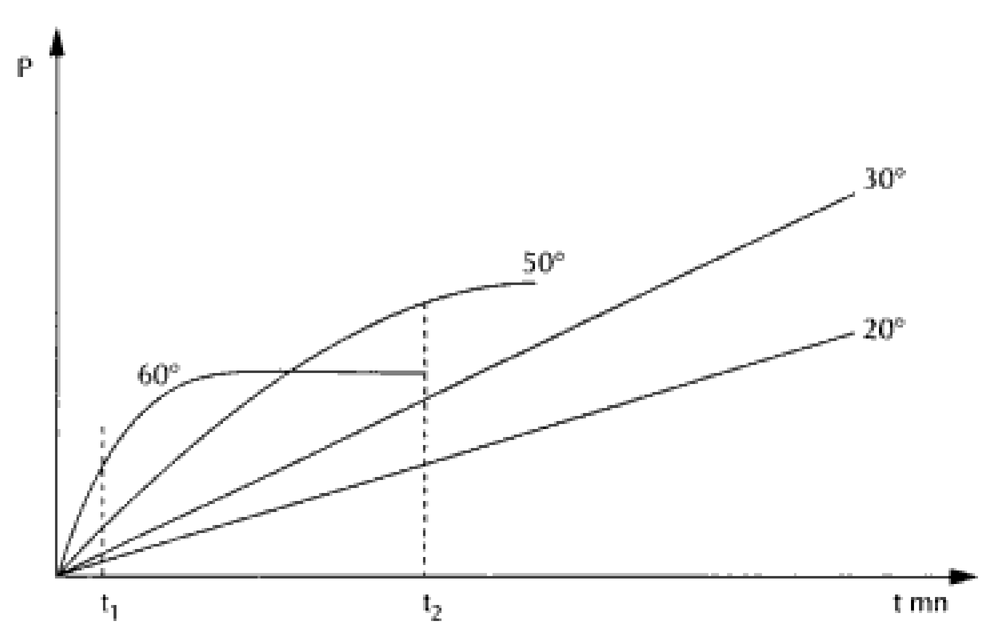


Figure 3. Influence de la température sur la réaction enzymatique
Critères de choix de la température optimale

III. Modalités de la détermination des activités enzymatiques

Nous venons de voir que l'activité catalytique se mesure par la détermination de la Vm de la réaction ou une Vi proche de la Vm. L'aspect pratique de cette mesure repose sur la connaissance de nombreux paramètres qu'il est impératif de maintenir à une valeur constante pendant tout le temps de la mesure. En effet, Vm est fonction de la nature et de la concentration de l'enzyme, de la nature du substrat si l'enzyme en tolère plusieurs, du pH, de la température, et des effecteurs divers. *Stricto sensu*, toutes les méthodes utilisées sont nécessairement des méthodes cinétiques puisque l'on mesure des vitesses dans tous les cas. Il est habituel cependant de faire une distinction entre les méthodes dites « en deux points » (mesure discontinue) et les méthodes dites « cinétiques » qui estiment la pente de la droite correspondant à la Vm (mesure « continue »).

A. Méthodes en deux points : cinétiques en un temps fixé

On mesure la quantité de produit apparue ou la quantité de substrat disparue au bout d'un temps fixé. Ce sont les méthodes qui étaient utilisées au tout début de l'enzymologie et qui le sont encore quand il est impossible de mesurer directement S ou P.
Généralement, on arrête brutalement la réaction au bout du temps fixé soit par action de la chaleur soit par un changement de pH (entre autres) et l'on mesure la concentration en S ou P dans le milieu réactionnel, avec ou sans extraction préalable, à l'aide de n'importe quelle méthode analytique convenable et appropriée.
Exemple : mesure de l'activité de la diamine-oxydase par radiométrie. La méthode utilise comme substrat la ^{14}C putrescine qui est transformée par la diamine-oxy-

dase en ^{14}C delta-1-pyrroline. Après quinze minutes exactement, la réaction est arrêtée par l'addition d'un inhibiteur puissant, l'aminoguanidine. Le produit de la réaction (pyrroline) est extrait sélectivement par un liquide scintillant et la radioactivité de la pyrroline marquée est mesurée à partir de cet extrait.

Remarque : mise à part la faible praticabilité de ces méthodes, peu automatisables et consommatrices de temps, leur valeur n'est pas inférieure à celle des autres si les conditions opératoires sont rigoureuses et standardisées (température, pH, substrats, limite de linéarité…). C'est, en fait, le nombre d'étapes nécessaires à la mesure de la concentration de substrat ou de produit en fin de réaction qui, en augmentant les causes d'erreurs, conditionne la reproductibilité des résultats.

Ces méthodes sont remplacées avantageusement par les méthodes immunologiques qui mesurent directement la protéine-enzyme (ex. : dosage de la rénine).

B. Méthodes cinétiques directes

La mesure de la vitesse de la réaction est effectuée de façon continue. En fait, la variation d'un signal est appréciée dans des temps très rapprochés. Cette façon d'opérer permet de calculer, dans de bonnes conditions, la pente de la droite correspondant à la vitesse de la réaction. Seules quelques méthodes analytiques sont adaptées à cette mesure directe dans le milieu réactionnel. Ce sont essentiellement la spectrophotométrie d'absorption dans le visible et l'ultraviolet, la spectrofluorimétrie, la turbidimétrie, la conductimétrie, la potentiométrie et la polarographie.

1. Spectrophotométrie d'absorption

On enregistre en continu une variation d'absorbance (densité optique) en fonction du temps : dA/dt.

Plusieurs cas sont à envisager :

- le substrat n'absorbe pas à une longueur d'onde donnée alors que le produit absorbe. On suit par conséquent l'augmentation d'absorbance. Exemple : Substrats qui libèrent le paranitrophénol en milieu alcalin (λ = 405 nm) ou transformation du NAD^+ en NADH, H^+ (λ = 340 nm) ;
- le produit n'absorbe pas à une longueur d'onde donnée alors que le substrat absorbe, on mesure donc une diminution d'absorbance. Exemples :
  - NADH, $H^+ \rightarrow NAD^+$ (λ =340 nm),
  - acide urique → allantoïne (λ = 293 nm) ;
- il existe une différence d'absorption entre le substrat et le produit à une certaine longueur d'onde. Il est encore possible de suivre la cinétique en utilisant un coefficient d'extinction molaire différentiel. En effet, la loi d'additivité des absorbances permet d'écrire pour un trajet optique de 1 cm :

$$A\lambda = \varepsilon\lambda_s\,|S| + \varepsilon\lambda_p\,|P|$$

Par un artifice de calcul faisant ressortir $|S| + |P|$ on a :

$$A\lambda = \varepsilon\lambda_s\,(|S| + |P|) + (\varepsilon\lambda_p - \varepsilon\lambda_s)|P|$$

- $\varepsilon\lambda_s$ et $\varepsilon\lambda_p$ sont les coefficients d'absorption molaire de S et P respectivement pour 1 cm de trajet optique (= épaisseur de la cuve de mesure).

Pour une réaction enzymatique, à chaque instant, le substrat est transformé en produit. Si on s'exprime en moles, la concentration de |S| + |P| est une constante. Il s'ensuit que la variation de $A\lambda$ est fonction uniquement de la variation de P : *le coefficient d'absorption molaire différentiel* ($\varepsilon\lambda_p - \varepsilon\lambda_s$) étant le facteur de proportionnalité. Dans des conditions opératoires données, la longueur d'onde choisie devra nécessairement correspondre à la valeur la plus élevée de ce coefficient pour obtenir la meilleure sensibilité de la technique.

a) Utilisation du coenzyme NAD en spectrophotométrie

■ *Réactions*

Ce coenzyme d'oxydoréduction est en grande partie responsable par ses qualités du développement des méthodes spectrophotométriques en enzymologie ; il est commun à de nombreuses oxydoréductases qui apportent la spécificité à la réaction catalysée.

$$AH_2 + NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$$

Les réactions enzymatiques pour lesquelles le NAD est impliqué sont considérées comme des réactions à deux substrats. En conséquence, la concentration de NAD (ou NADH) doit être choisie selon les mêmes critères que dans le cas des substrats. La variation de NAD (ou NADH), puisqu'il interagit mole à mole avec le substrat, est directement utilisable pour mesurer la vitesse de la réaction. Les mêmes avantages sont retrouvés pour le $NADP^+/NADPH, H^+$.

■ *Qualités du couple NAD/NADH en enzymologie*

Le spectre d'absorption (fig. 4) présente un maximum d'absorption *à 340 nm pour le NADH alors que le NAD^+ n'absorbe pas à cette longueur d'onde.*
Le coefficient d'absorption différentiel est élevé. Cette absorption dans le proche UV ne nécessite pas l'emploi de cuves spéciales.
En l'absence d'enzyme, le NADH est peu auto-oxydable et sa conservation est bien supérieure à celle d'autres composés fréquents dans les milieux réactionnels.

b) Utilisation du coefficient d'absorption molaire pour le calcul des activités à partir des variations d'absorbance

Dans la pratique quotidienne, on n'enregistre plus en continu la variation d'absorbance. On mesure l'absorbance à intervalles de temps réguliers et rapprochés (entre la seconde et 15 secondes selon les automates) ce qui permet une bonne estimation de la pente obtenue par différents modes de calcul (voir plus loin). La pente $\Delta A/\Delta t$ devient $\Delta A/\Delta t$ correspondant à la Vm mesurée.
Connaissant le coefficient d'absorption molaire de la substance qui absorbe à la longueur d'onde choisie, on calcule l'activité en UI/L ou kat/L :

$$A = \varepsilon . I . C \qquad C = \frac{A}{\varepsilon . I}$$

avec :
- ε = l'absorbance A d'une solution à 1 mole/L mesurée pour un trajet optique de 1 cm ;
- c = concentration molaire dans la cuve de S ou P mesuré ;
- I = trajet optique = épaisseur de la cuve en cm.

c) Méthode par régression linéaire

Elle est représentée sur la *figure* 6.

Cette méthode compare un grand nombre d'absorbances rapprochées dans le temps. Un calcul est ensuite effectué pour obtenir des pentes (b) à partir d'un certain nombre de points (4, 5, ou plus selon les automates).

Les valeurs de b ainsi obtenues sont comparées entre elles : dans le cas représenté sur la *figure* 6, seules les valeurs de b1 à b3 sont retenues. Enfin, une pente moyenne (b_n) est déterminée pour le calcul de la vitesse.

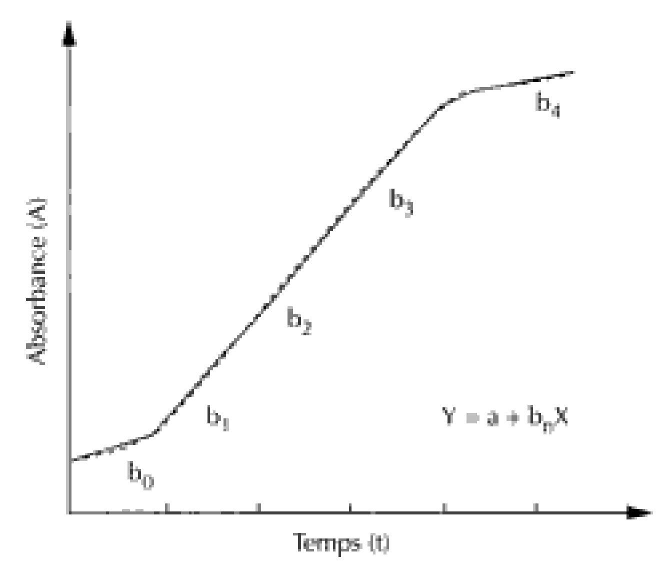


Figure 6. Représentation graphique de la méthode de calcul par régression linéaire

d) Méthode par intégration

Elle est représentée sur la *figure* 7.

Dans cette méthode, on compare les aires obtenues sous la courbe expérimentale par unité de temps. Seules les surfaces très proches sont retenues.

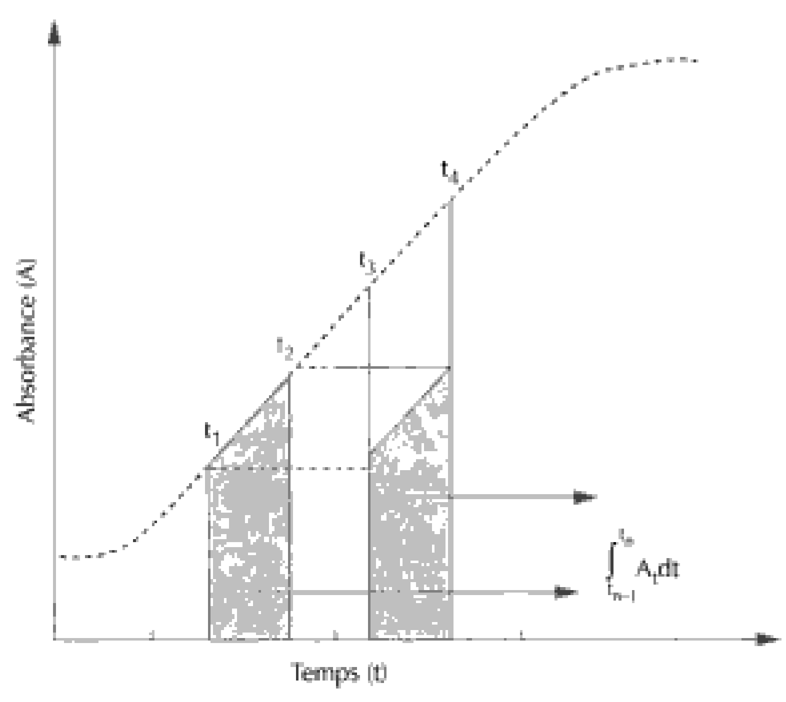


Figure 7. Représentation graphique de la méthode de calcul par intégration des surfaces sous la courbe obtenue

A. Choix de la méthode : standardisation, optimisation

Le problème s'est sérieusement simplifié depuis l'apparition des méthodes standardisées. En effet, de nombreuses techniques ont été éliminées en partie parce qu'elles n'étaient pas automatisables mais aussi parce que leur reproductibilité ou leur sensibilité étaient défectueuses. Une autre contrainte, cette fois propre à la biologie clinique, a favorisé la standardisation des méthodes : les résultats d'enzymologie (exprimés en UI/L) ne peuvent être comparés que si les conditions opératoires sont strictement identiques. Des efforts considérables ont donc été fournis à l'échelon national (Société française de biologie clinique) et international (International federation of clinical chemistry) pour choisir les méthodes les plus appropriées.

La *standardisation* consiste, dans un premier temps, à choisir le principe de la méthode ; exemple : mesure de l'activité de l'ASAT par deux réactions consécutives avec mesure spectrophotométrique du $NADH^+$ consommé.

Puis, dans un second temps, la standardisation s'est étendue au choix de tous les paramètres : température, pH, nature du tampon, des substrats et des cofacteurs nécessaires, élimination des réactions parasites.

Enfin, dans un troisième temps, l'*optimisation* a consisté à déterminer pour chaque paramètre la concentration qui optimise, c'est-à-dire qui rend maximale la vitesse de réaction pour une concentration donnée en enzyme. Les méthodes d'évaluation des principales activités enzymatiques du sérum sont actuellement standardisées et optimisées. Ce sont de toute évidence les méthodes recommandées par les différentes sociétés savantes. Seule la standardisation de la température (25, 30, 37 °C) pose encore quelques problèmes au niveau international : rappelons qu'une activité enzymatique mesurée à 30 °C ne doit pas être extrapolée à 37 °C (et vice versa).

Quelle méthode choisir s'il n'existe pas de méthode recommandée pour la mesure de l'activité désirée ?

La solution à ce problème est difficile car elle est particulière à chaque enzyme. Le tout est de trouver une *méthode acceptable pour les besoins de la clinique*. Ex. : pour le dosage de l'activité alpha-amylasique du sérum, il est de beaucoup préférable d'utiliser comme substrat un polysaccharide de faible masse moléculaire parfaitement défini, plutôt que l'amidon préhydrolysé ou des mélanges de dextrines dont les compositions sont obligatoirement variables d'un lot à l'autre. En effet, en l'absence d'étalonnage, le manque de reproductibilité de ce type de substrats conditionne la mauvaise reproductibilité de la méthode.

B. Utilisation d'un réactif prêt à l'emploi

Il est impératif de respecter scrupuleusement les conditions opératoires précisées dans la méthode. Celles-ci peuvent se décomposer ainsi :

1. Température

C'est le facteur qui influence le plus la vitesse de la réaction. Un gain de 10 °C double approximativement la vitesse. Une thermorégulation efficace de la réaction est donc nécessaire à ± 0,05 °C près. La température doit être celle pour laquelle la méthode a été standardisée.

2. Ordre d'introduction des réactifs et préincubation

Mis à part les précautions à prendre pour reconstituer les réactifs, l'ordre d'introduction de ces derniers et la préincubation doivent être rigoureusement respectés car ils permettent de mettre en température le milieu réactionnel, de réactiver l'enzyme éventuellement, d'éliminer les interférences des réactions parasites lorsqu'il y a lieu.
En pratique, le sérum est incubé en présence de l'ensemble des réactifs (tampons, coenzymes, et enzymes éventuelles des réactions consécutives) sauf le substrat spécifique de l'enzyme à mesurer. Celui-ci est utilisé à la fin de cette phase pour démarrer la réaction (*fig. 8*).

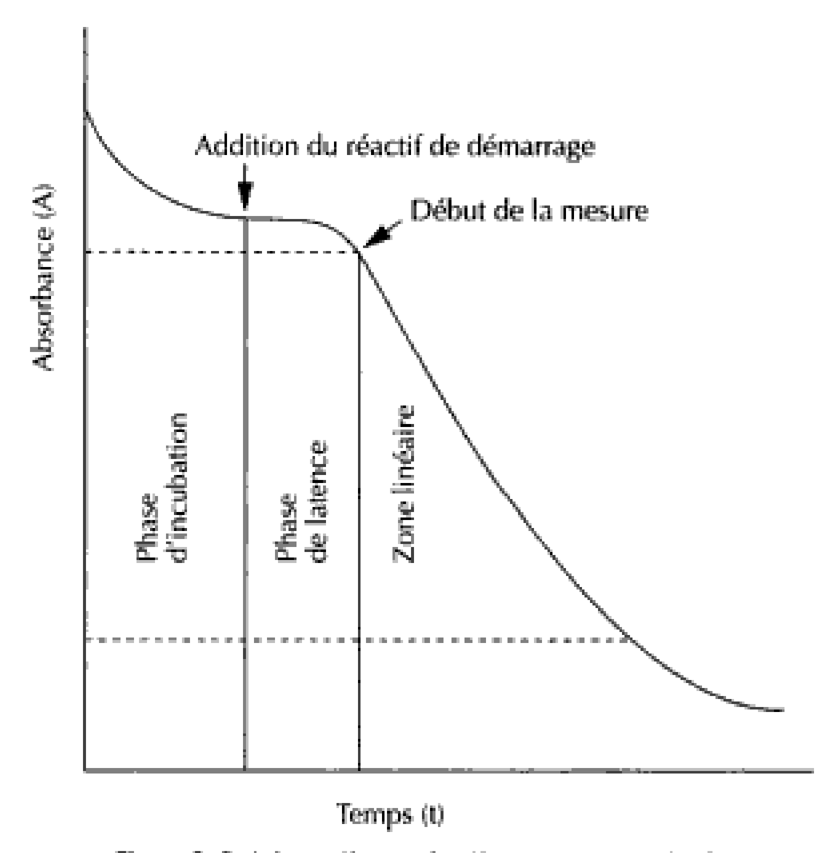


Figure 8. Schéma d'une réaction en enzymologie

3. Mesure de la vitesse et calcul des résultats

Une phase de latence est observée fréquemment lors des réactions simples (LDH, PAL). Pendant ce laps de temps, une vitesse variable est constatée et ne doit pas être mesurée.
Le calcul des activités (UI/L) s'effectue à partir de la pente de la zone linéaire en utilisant le coefficient défini précédemment en vérifiant que le trajet optique du spectrophotomètre utilisé correspond bien à celui qui a servi à l'établir.

4. Blanc réactif et blanc sérum

Deux types de blancs peuvent être pratiqués : le blanc réactif contrôle la stabilité du réactif et la présence éventuelle d'enzymes contaminant les enzymes indicatri-

ces (ex. : traces de transaminases dans la MDH). Ce blanc est pratiqué une fois par lot de réactifs. Dans certains cas un blanc sérum permettra d'évaluer l'efficacité de l'élimination des réactions parasites par la préincubation. Il est inutile pour les méthodes recommandées.

5. Linéarité

Un réactif prêt à l'emploi impose à l'utilisateur une concentration de substrat calculée pour rester à saturation pour les activités habituellement rencontrées dans le sérum. Pour les activités enzymatiques trop élevées, le substrat ne restant pas à saturation pendant toute la durée de la mesure, la vitesse n'est plus constante, ce qui est contraire au principe même de la méthode. La seule solution est de diluer l'enzyme afin de retrouver des activités convenables.
Chaque méthode comporte donc une limite de linéarité exprimée soit en activité soit en variation d'absorbance. Seules les valeurs inférieures ou égales à cette limite sont utilisables.
Remarques : la limite de linéarité dépend, comme nous venons de le voir, des concentrations respectives en substrat et en enzyme. Elle est fonction aussi de la durée de la mesure (elle augmente quand le temps de mesure se raccourcit) et de la température (quand la température augmente, la consommation de substrat augmente et la limite de linéarité diminue).

6. Adaptation d'une méthode à un auto-analyseur

Les méthodes recommandées sont toujours manuelles. C'est généralement le fabricant du réactif qui étudie cette adaptation. La plupart des appareils peuvent respecter les contraintes des protocoles opératoires (température, préincubation, démarrage, temps de mesure, taux de dilution du sérum dans le milieu réactionnel, etc.). Toute modification du protocole due à l'adaptation à l'appareillage doit être rigoureusement contrôlée afin de vérifier son influence sur le résultat. En effet, cela est une cause fréquente de variabilité des résultats interlaboratoires.

7. Contrôle de qualité des mesures

Comme nous l'avons vu, l'étalonnage des mesures des activités enzymatiques dans le sérum est utopique. Par contre, l'utilisation de sérums dosés en contrôle de qualité devient une nécessité absolue pour éviter les biais dans les résultats (coefficient d'absorption molaire erroné, trajet optique mal évalué, obstruction des systèmes de prélèvements, thermorégulation défectueuse, mauvaise adaptation de la méthode, etc.).
Les difficultés rencontrées avec les sérums de contrôle lyophilisés sont d'ordre divers :

- stabilité après la régénération (CK),
- réactivation éventuelle de certaines enzymes (PAL : 24 heures),
- origine animale de ces sérums dont certaines enzymes peuvent réagir différemment des enzymes humaines.

L'essentiel de la question

On mesure la quantité d'enzyme dans un milieu biologique en déterminant son activité catalytique qui lui est proportionnelle.
L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de transformation du substrat de l'enzyme en produit. En l'absence d'étalonnage, on doit impérativement mesurer une vitesse maximum obtenue par saturation de l'enzyme en substrat.
La vitesse maximum (Vm) dépend de la quantité d'enzyme, de la nature du substrat, des différents effecteurs (pH, tampons, température).
Les méthodes utilisées mesurent une vitesse de réaction soit en temps préfixé avec arrêt de la réaction et mesure des produits, soit par une mesure directe en continu s'il existe une différence suffisante entre les coefficients d'absorption molaire du substrat et du produit.
Les propriétés intéressantes du coenzyme NAD sont exploitées quand le substrat ou le produit de l'enzyme à mesurer ne présentent pas de propriétés spectrales utilisables. On utilise deux ou trois réactions consécutives catalysées par des enzymes ajoutées. La réaction indicatrice catalyse une déshydrogénase ayant comme coenzyme le NAD ou le NADP.
L'addition d'enzymes apporte un certain nombre de contraintes (préincubation). La réaction à mesurer doit être limitante pour les réactions suivantes.
Les méthodes utilisées doivent être standardisées et optimisées.

Les méthodes enzymatiques représentent plus de 90 % des méthodes utilisées en France par les laboratoires d'analyses médicales pour doser les métabolites habituels dans les milieux biologiques. Mais ces méthodes sont aussi largement utilisées en agroalimentaire et dans les divers laboratoires de contrôle.
Certes, les enzymes apparaissent de plus en plus comme les meilleurs réactifs pour mesurer les concentrations en métabolites dans les milieux complexes (et en particulier les liquides biologiques) en raison principalement de leur grande spécificité.
Les enzymes se lient en général à, un seul type de molécule, et en outre, leur effet catalytique est très rapide. La spécificité, la rapidité, l'abaissement du coût d'isolement des enzymes concernées et la diminution du volume réactionnel grâce à l'automatisation des méthodologies, ont permis le développement prodigieux des méthodes enzymatiques dans cette dernière décennie.
C'est essentiellement l'isolement d'enzymes d'origine bactérienne ou végétale inconnues chez l'homme qui a fortement contribué à cet essor. Citons l'exemple de la cholestérol-oxydase, de l'uricase, de l'uréase, de la créatininase, de la glucose-déshydrogénase et de la glucose-oxydase.
Les biotechnologies qui sont en plein développement actuellement font de plus en plus appel aux biocapteurs, terme nouvellement forgé qui désigne les enzymes couplées à des systèmes de détection divers. Il faut d'ailleurs reconnaître que pour un bon nombre de méthodes modernes, seule une des qualités du réactif enzyme est exploitée. En effet c'est soit : la spécificité de l'enzyme qui est retenue et ce sont des méthodes d'analyses classiques qui sont couplées à l'action enzymatique pour mesurer les produits de la réaction, ou le substrat consommé. Soit c'est l'effet catalytique qui est choisi et l'enzyme est alors utilisée comme un marqueur d'une autre réaction qui elle, apporte la spécificité (Immuno-enzymologie).

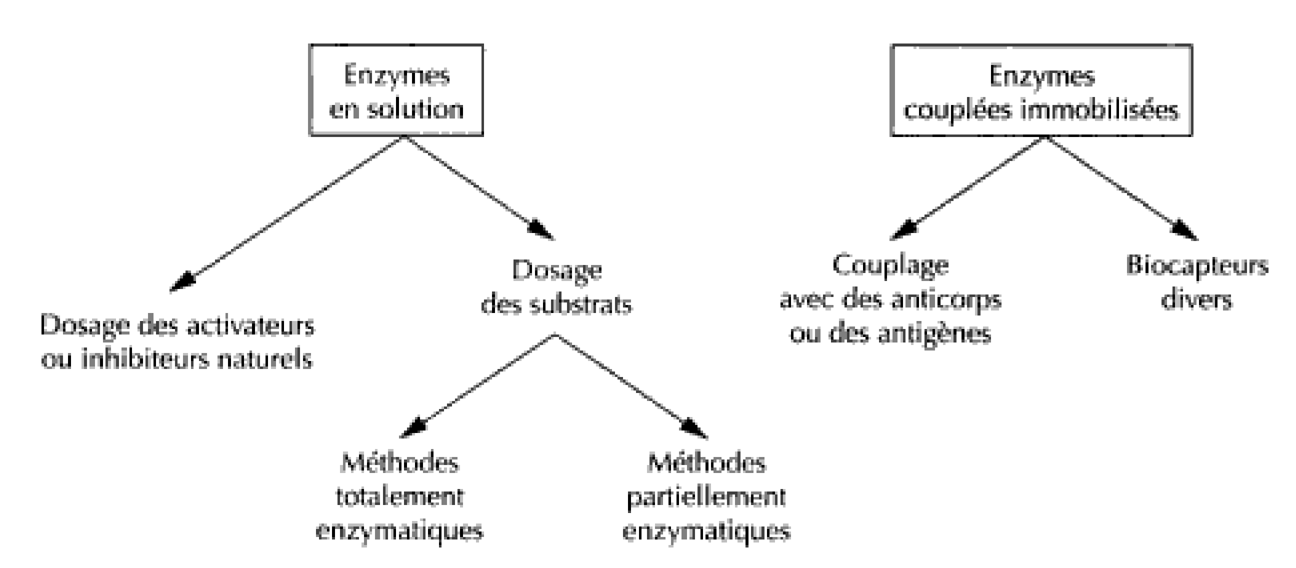


Figure 1. Utilisation d'enzymes pour le dosage de métabolites

Les méthodes de dosages utilisant l'enzyme comme réactif sont rassemblées dans la figure 1 qui correspond au plan que nous utiliserons.
Si l'utilisation des enzymes comme réactif est simple, un certain nombre de règles élémentaires, tant théoriques que pratiques doivent être respectées. Ces règles découlent de propriétés inhérentes à la catalyse.

$$\text{L-lactate} + \text{NAD}^+ \underset{②}{\overset{\text{LDH} \atop ①}{\rightleftharpoons}} \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{pyruvate} + \text{hydrazine}$$

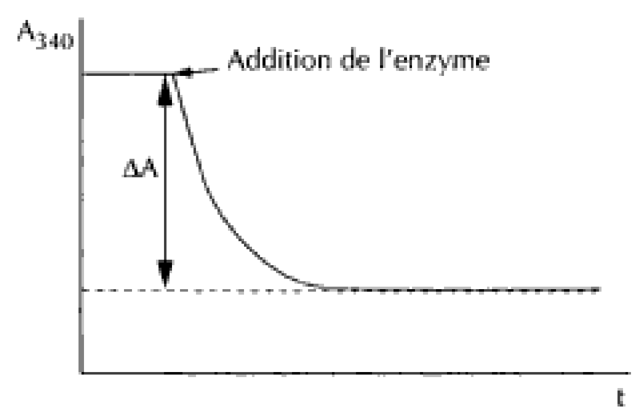
L'équilibre de cette réaction est très en faveur de la formation du L-lactate (sens 1). L'enzyme ne permet donc pas de transformer totalement le L-lactate en pyruvate. En revanche, on peut déplacer l'équilibre par élimination du pyruvate au fur et à mesure de son apparition en ajoutant de l'hydrazine au milieu réactionnel. La formation d'hydrazone avec la fonction cétone du pyruvate déplace l'équilibre de la réaction dans le sens 2.

Le piégeage enzymatique constitue la deuxième possibilité : il est beaucoup plus pratiqué. On utilise en fait toutes les possibilités offertes par les réactions consécutives (*cf. infra*). L'équilibre est déplacé par la réaction indicatrice qui doit présenter impérativement un équilibre favorable.

a) Réalisation pratique d'une mesure de concentration de substrat « au point final » (dosage au point final)

Les méthodes enzymatiques au point final peuvent théoriquement se passer d'un étalonnage puisque l'équilibre ne dépend pas de la concentration d'enzyme mais seulement du temps. De faibles variations des concentrations d'enzyme d'un lot de réactifs à l'autre n'ont pas d'influence si le temps mis par la réaction pour atteindre l'équilibre est calculé largement. Toutefois, il est préférable de pratiquer un étalonnage à l'aide d'une solution du substrat à doser.

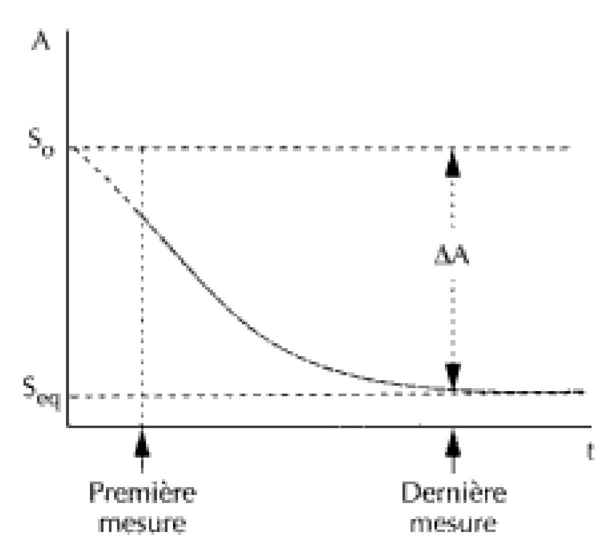
La réalisation pratique de cette méthode nécessite deux mesures : une première mesure du signal au temps zéro et une deuxième mesure quand l'équilibre est atteint. La mesure au temps zéro peut être effectuée en pratiquant un blanc de la réaction constitué de tous les réactifs nécessaires mais en omettant l'enzyme (*fig.* 3).



La variation d'absorbance ΔA est proportionnelle à la différence entre la concentration initiale de substrat S_0 et la concentration de substrat à l'équilibre S_{eq}.

Figure 3. Dosage d'un substrat par la méthode au point final

Une meilleure estimation de la mesure du signal au temps zéro est possible sur certains analyseurs centrifuges. L'absorbance au temps zéro est calculée par extrapolation (régression non linéaire) à partir des données obtenues (*fig.* 4) au début de la mesure.



L'absorbance au point zéro est calculée par extrapolation des données obtenues au cours des premières mesures.

Figure 4. Dosage d'un substrat par la méthode au point final avec extrapolation

b) Calcul du temps mis pour atteindre l'équilibre

Le temps mis pour atteindre l'équilibre (t) est pour une réaction d'ordre 1 (c'est-à-dire quand $S_0 << Km$) :

$$t = \frac{2,3}{k} \log \frac{S_0}{S_{eq}}$$

Notons que si la réaction est quasi-complète (99 % de S est transformé), le rapport S_0/S_{eq} est constant et égal à $\log 10^2 = 2$; il est donc indépendant de S_0 si $S_0 < Km$. Le temps d'atteinte de l'équilibre dépend donc essentiellement de K qui est égal, pour une réaction enzymatique en condition non saturante, à :

$$K = \frac{Vm}{Km} = \frac{kcat|Et|}{Km}$$

Ce temps dépend de la concentration de l'enzyme (Et) et des caractéristiques propres de cette enzyme (kcat et Km).

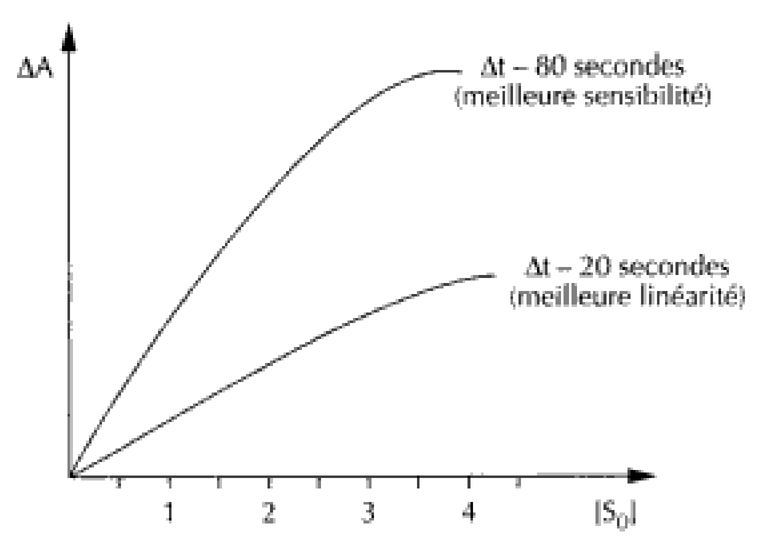
2. Méthodes cinétiques utilisant la vitesse initiale

Rappelons l'équation de Michaelis $Vi = \frac{Vm|S_0|}{Km + |S_0|}$

On remarque que si $S << Km$ l'équation de Michaelis se simplifie puisque S devient négligeable devant Km au dénominateur (réaction d'ordre 1).

$$Vi = \frac{Vm}{Km}|S_0|$$

Pour une concentration fixée en enzyme, Vm est une constante et par conséquent Vi est directement proportionnelle à $|S_0|$.
En pratique, on considère que pour $S_0 < 0,1$ km, ces conditions sont réalisées (*fig.* 5).
Notons qu'un étalon est absolument nécessaire puisque le signal mesuré sera directement proportionnel à $|S_0|$ et à la concentration en enzyme qu'il est difficile de rendre reproductible.



Zone utilisable de concentration initiale de substrat dans le milieu réactionnel.

Figure 8. Cinétique en deux temps préfixés : choix des temps de mesure

4. Conclusion

Pour mesurer un substrat par une enzyme, il existe un certain nombre de contraintes plus ou moins contournables.

- L'enzyme doit être *spécifique* pour le substrat.
- L'*efficacité catalytique* kcat/Km de l'enzyme doit être la plus élevée possible, (enzyme suffisamment active) si l'on a le choix entre plusieurs enzymes.
- L'*équilibre de la réaction* doit être favorable. Ce qui signifie que lorsque l'équilibre est atteint, 98 % du substrat a été transformé en produit.
- La *concentration de l'enzyme* doit être suffisante pour que l'équilibre soit atteint dans des temps acceptables (quelques minutes).
- La mesure de la disparition de S ou de l'apparition de P doit être *sensible et pratique*.

D. Procédés utilisés pour mesurer S ou P

En pratique les méthodes que nous venons d'étudier doivent mesurer la disparition du substrat ou l'apparition du produit de la réaction. Toutes les méthodes existantes pour mesurer une activité enzymatique sont théoriquement utilisables. Toutefois les méthodes rapides, sensibles et automatisables sont préférables. On remarque que coexistent actuellement des méthodes entièrement enzymatiques et des méthodes partiellement enzymatiques.

1. Méthodes entièrement enzymatiques

a) Détection directe de S ou de P

Spectrophotométrie

Exemple : mesure de l'apparition ou de la disparition de NADH, H^+ à 340 nm :

$$NADH, H^+ \rightleftharpoons NAD^+$$

Applications : dosage du pyruvate par la LDH, dosage du glucose par la glucose-déshydrogénase.

Conductimétrie

Exemple : mesure de la conductivité du milieu réactionnel à l'aide d'une électrode.
Application : dosage de l'urée par l'uréase, la libération d'ions NH_4^+ et HCO_3^- augmente la conductivité du milieu.

Polarographie

Exemple : mesure de l'oxygène consommé au cours d'une réaction par une électrode à pO_2.
Application : dosage du glucose par la glucose-oxydase avec mesure de l'oxygène consommé par une électrode de Clark.

b) Détection indirecte de S ou P

Si S ou P ne présentent pas de propriétés spectrales ou autres susceptibles de permettre leur mesure directe, des réactions consécutives catalysées par des enzymes sont utilisées lorsque cela est possible.

Exemple : $S \xrightarrow{E_1} P$ réaction spécifique du produit à mesurer,

$P \xrightarrow{E_2} Q$ réaction auxiliaire,

$Q \xrightarrow{E_3} R$ réaction indicatrice.

Si E_2 catalyse une réaction à deux substrats (par exemple $P + X \xrightarrow{E_2} Q$), il sera nécessaire d'ajouter en excès le substrat X qui accompagne P pour que seul ce dernier soit un facteur limitant de la réaction.
Il suffit donc de trouver des enzymes convenables susceptibles de transformer le produit P de la réaction en un composé aisément mesurable par les méthodes décrites précédemment.
Comme dans le cas des mesures des activités catalytiques, il est possible d'avoir trois (ou plus) réactions consécutives pour obtenir ce résultat, la dernière est généralement catalysée par une déshydrogénase ayant comme coenzyme le NAD^+ (réaction indicatrice) afin de conserver la grande sensibilité de la mesure d'apparition ou de disparition du NADH, H^+ par spectrophotométrie.
Les méthodes au point final et les méthodes cinétiques utilisent largement les réactions consécutives. Dans les méthodes au point final, la dernière réaction doit nécessairement déplacer l'équilibre des réactions précédentes (spécifiques et auxiliaires) afin que le substrat à mesurer soit totalement consommé.
Applications : le meilleur exemple de ce type de méthode est celui du dosage des triglycérides qui comporte quatre réactions successives et qui montre bien les limites d'utilisation d'un tel procédé pour un milieu aussi complexe que le sérum.

- La lipase choisie catalyse l'hydrolyse des triglycérides de façon quasi complète.
- L'emploi de la LDH comme catalyseur de la réaction indicatrice permet de conserver une bonne sensibilité.
- La présence ici de deux réactions auxiliaires comportant chacune deux substrats et deux produits impose une saturation du système en ATP et PEP qui devront être ajoutés au milieu réactionnel parce que leur concentration insuffisante dans le sérum serait limitante pour l'ensemble des réactions.

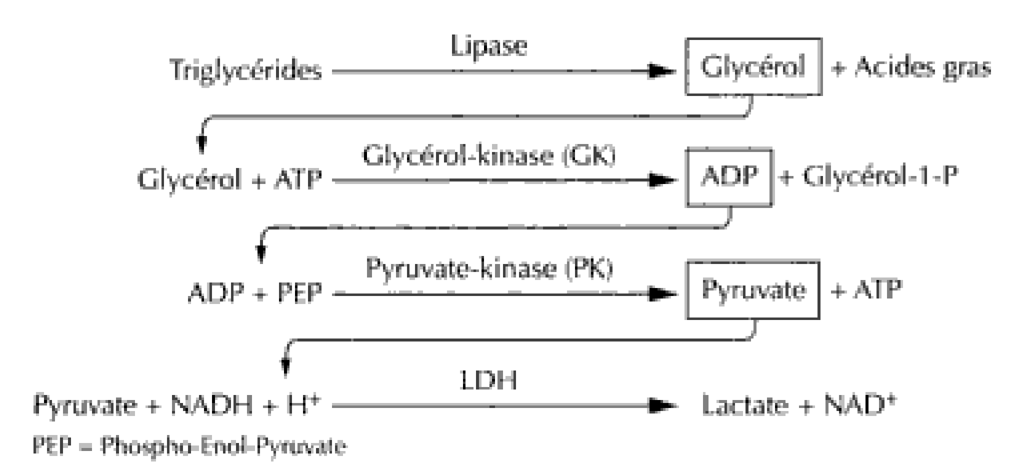


Figure 9. Principe de dosage des triglycérides

- Pratiquement, le mélange NADH, ATP, PEP, LDH, PK et lipase est d'abord incubé avec le sérum. Quand le premier équilibre est atteint, la glycérol-kinase est ajoutée : c'est le point zéro du dosage. Cette façon d'opérer élimine un certain nombre de réactions parasites consommant de l'ATP (autres kinases du sérum), du NADH (pyruvate endogène) mais n'élimine pas le glycérol endogène (0,1 mmol/L en moyenne).

2. Méthodes partiellement enzymatiques

Dans ces méthodes, le produit de la réaction, ou le produit final s'il s'agit de réactions consécutives, est mesuré par spectrophotométrie après action d'un réactif chimique. Ce sont essentiellement les réactions productrices de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont concernées. La spécificité de cette réaction chimique conditionne entièrement l'exactitude du dosage et en fait très peu de réactifs sont utilisables.
Citons : la réaction de *Hantzch* qui utilise la catalase :

$$H_2O_2 + CH_3OH \rightarrow HCHO + 2H_2O$$

$$HCHO + 2\ \text{acétylacétone} + NH3 \rightarrow \text{diacétyl-3,5-dihydro-1,4-lutidine} + 3H_2O$$

La réaction de *Trinder* qui utilise la peroxydase :

$$H_2O_2 + \text{aminophénone} + \text{phénol} \rightarrow H_2O + \text{dérivé coloré.}$$

Ces deux réactions ne sont pas à l'abri d'interférences avec des composés du sérum comme la bilirubine. D'une façon générale, pour ce type de réaction, tous les réducteurs et les oxydants présents dans le sérum en quantité non négligeable vont interférer.

E. Méthodes de dosage des effecteurs des enzymes

Ces méthodes sont utilisables si l'effet de l'inhibiteur ou de l'activateur est suffisamment important.
À titre d'exemples :
Le dosage du complexe calmoduline-calcium utilise la phospho-diestérase (PDE) de l'AMPc qui est activée par ce complexe.

$$\text{Calmoduline-}Ca^{2+}$$
$$\downarrow +$$
$$\text{PDE}$$
$$\text{AMPc} \rightarrow \text{AMP}$$

On mesure ici, pour une concentration donnée d'AMPc et de PDE, l'augmentation de la vitesse de la réaction obtenue par le complexe calmoduline-calcium qui est fonction de la concentration de ce dernier.
Le dosage de l'antithrombine III peut être effectué en mesurant son effet inhibiteur sur l'activité de la thrombine. Cette méthode est spécifique dans le sérum si le substrat chromogénique utilisé est spécifique de la thrombine.
Pratiquement, le sérum est mis en présence d'une quantité connue et en excès de thrombine et d'héparine. L'activité résiduelle de la thrombine (proportionnelle à la quantité d'antithrombine III) est détectée par le D-Phe-Pip-Arg-pNA qui est un substrat chromogène (pNA = paranitro-anilide, Pip = acide pipécolique) spécifique de la thrombine.

II. Enzymes immobilisées

L'utilisation d'une enzyme comme réactif nécessite une purification toujours très coûteuse afin d'obtenir une activité élevée et une spécificité convenable. L'idée d'immobiliser les macromolécules d'enzyme afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles de dosage s'est donc rapidement imposée.
Le pouvoir catalytique permet également d'utiliser l'enzyme comme un marqueur d'autres molécules. L'immobilisation utilise des méthodes très générales qui ne sont pas nécessairement particulières aux enzymes et que nous avons rassemblées dans la *figure 10*.

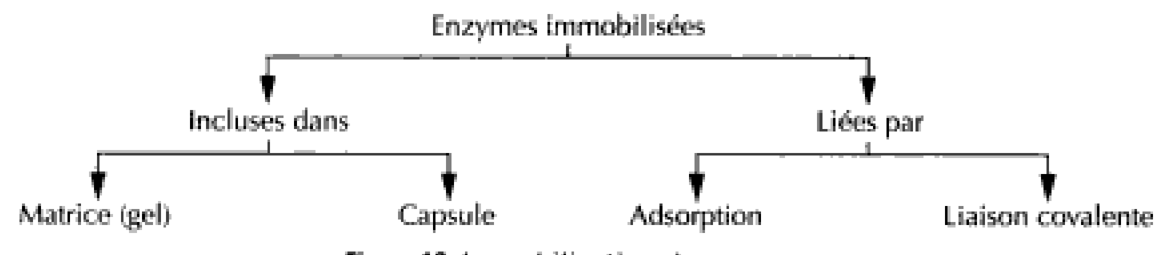


Figure 10. Immobilisation des enzymes

1. Immobilisation par inclusion

Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau, ou emprisonnées dans des microcapsules délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction. Ces deux procédés d'immobilisation permettent de piéger de fortes quantités d'enzyme mais le désavantage réside dans la difficulté pour le substrat de diffuser rapidement vers l'enzyme.

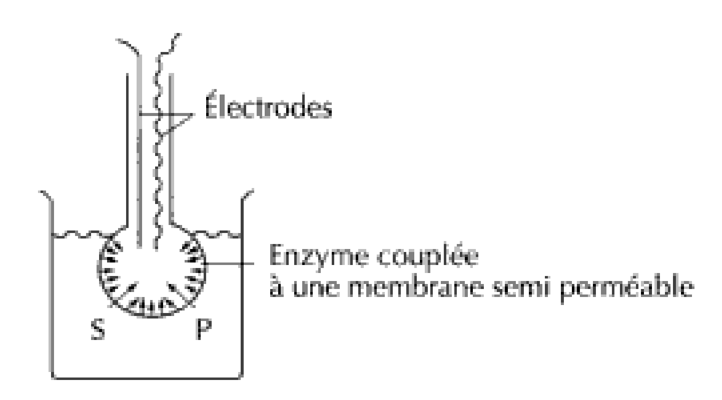
2. Immobilisation par liaison covalente

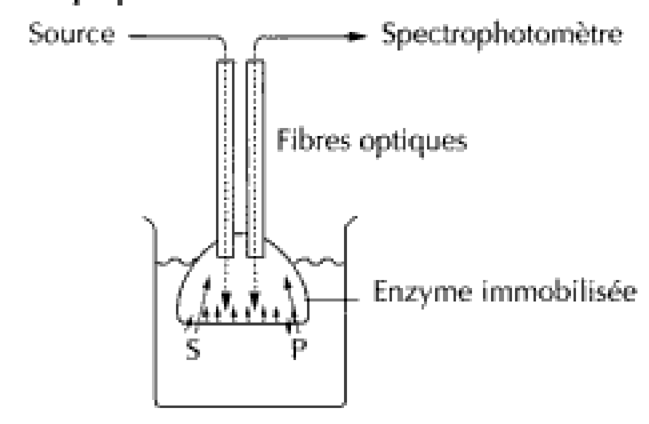
Des méthodes chimiques capables de fixer différents groupes réactifs sur les macromolécules se sont largement développées au cours des trente dernières années. Les conditions sont actuellement suffisamment douces (pH et température) pour que les propriétés biologiques des protéines, et notamment la fixation sélective d'un ligand, soient conservées après la modification.

L'enzyme peut être couplée à l'antigène ou à l'anticorps ; dans les deux cas, la formation du complexe antigène-anticorps peut soit laisser intacte l'activité catalytique de l'enzyme, soit inhiber ou activer cette dernière.
Le couplage de l'antigène à un inhibiteur de l'enzyme est une méthode très originale : dans ce cas, l'inhibition est levée par la fixation de l'anticorps.
Un certain nombre de contraintes inhérentes à ces méthodes doivent être précisées. *Le choix de l'enzyme n'est pas aléatoire.* Il est en fait le résultat d'un compromis entre la stabilité de ce catalyseur, la sensibilité et la praticabilité de la mesure de l'activité. Quand l'enzyme tolère des substrats de synthèse conduisant à la formation de produits fluorescents (4-méthyl-ombelliférone) ou chimioluminescents (luminol), il est tout particulièrement intéressant car la sensibilité du dosage est considérablement augmentée.
La vitesse de transformation du substrat en produit doit être proportionnelle à la concentration d'enzyme.
Cette condition est réalisée si la concentration du substrat reste saturante pendant toute la durée de la mesure. Comme les concentrations d'enzyme mesurables varient pour chaque technique dans des limites étroites fixées définitivement, il est aisé de calculer la concentration de substrat convenable.
Le choix de la meilleure technique de couplage de l'enzyme à l'antigène ou à l'anticorps est par contre beaucoup plus délicat à effectuer. Il existe en effet sur les antigènes et *a fortiori* sur les immunoglobulines de nombreux points d'ancrage. En outre, les enzymes étant douées de propriétés catalytiques, le ou les points d'ancrage doit ou doivent préserver le site actif où s'exerce cette catalyse. La contrainte est tout aussi sévère pour le point de couplage à l'anticorps ou à l'antigène : la fixation de l'antigène à l'anticorps ne doit en rien être perturbée par la présence de l'enzyme qui est une macromolécule dont la taille est du même ordre de grandeur que celle des immunoglobulines.
Les solutions apportées à ces problèmes sont par conséquent le résultat de compromis divers et nous nous limiterons à exposer le problème de la fixation de l'enzyme en réservant à l'immunologie les points soulevés par l'immunogénicité des antigènes à doser et par la spécificité des anticorps obtenus.
Les enzymes les plus utilisées appartiennent aux groupes des hydrolases (osidases, phosphatases) et des oxydo-réductases (peroxydases, oxydases) parce que, d'une part, aucune coenzyme n'est nécessaire et, d'autre part, on possède généralement des méthodes de mesure des activités enzymatiques sensibles et pratiques (spectrophotométrie, fluorimétrie, bioluminescence).
La fixation d'une enzyme sur une immunoglobuline se fait généralement au niveau du fragment Fc de cette dernière (*fig. 12*).

B. Biocapteurs

Les biocapteurs constituent la seconde application en biochimie analytique du couplage des enzymes à un support. Ils sont déjà utilisés dans de nombreux domaines : biochimie clinique, contrôle de qualité, agroalimentaire, bactériologie.
Un biocapteur se décompose en deux parties :
- *un système de reconnaissance* constitué dans la plupart des cas par une enzyme spécifique de la substance à doser ou à détecter. Notons que d'autres protéines de spécificité convenable comme des anticorps, des lectines ou des récepteurs





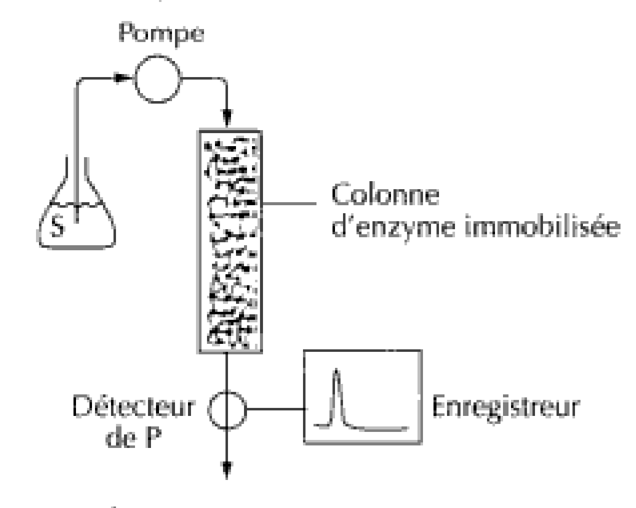


Figure 13. « Électrode à enzyme » et biocapteurs

C. Bioréacteurs

Une colonne contenant un support chargé en enzyme par liaison covalente est utilisée en flux continu. La différence entre le bioréacteur ainsi défini et un biocapteur réside dans le fait que la quantité d'enzyme est ici très élevée et que le détecteur de la réaction est éloigné de l'enzyme. Le substrat est introduit dans la colonne par une pompe *(fig. 13c)* et le détecteur placé en sortie de la colonne mesure la quantité de substrat consommé ou la quantité de produit apparue. Le coût de l'opération est faible et les cadences obtenues dépendent en fait du temps de réponse du détecteur.

Définitions des critères de qualité d'une méthode d'analyse

A. VASSAULT, Service de Biochimie, Hôpital Necker, AP-HP, Paris.

Différents critères de qualité doivent être pris en compte dans le choix, la sélection, le développement et le jugement d'une méthode analytique, de façon à assurer l'obtention de résultats remplissant les conditions nécessaires aux besoins du diagnostic, du traitement, de la surveillance et de la prévention des maladies.
La valeur et l'utilité d'un résultat d'analyse dépendent de la qualité du processus analytique mis en œuvre. Celle-ci résulte de la maîtrise de toutes les étapes de l'analyse depuis le prélèvement jusqu'à l'exploitation du résultat. La partie purement analytique consiste à effectuer, à partir d'un spécimen, un dosage en mettant en œuvre des procédés physiques, chimiques ou physicochimiques.
Après avoir défini les différents critères qui participent à la qualité du processus analytique en suivant les règles de terminologie proposées par la Société française de biologie clinique [23] et les instances de normalisation [1, 17] leur mode d'évaluation [12, 16, 24] sera développé et illustré par des exemples choisis.
Parmi ces critères, seront étudiés successivement la précision [1], la justesse, la spécificité, le domaine de mesure, la sensibilité et la détectabilité (limite de détection).
Les limites d'acceptabilité nécessaires à l'établissement de spécifications sont ensuite discutées.
La spécificité d'un signe biologique et sa sensibilité ne sont pas traitées dans le cadre de cet exposé, car leur étude se rapporte non pas à la validité d'une méthode d'analyse, mais à celle d'un test biologique [22].

I. Précision : répétabilité, reproductibilité

A. Définitions [17, 23]

1. Précision

Qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions déterminées.
La précision est également appelée « fidélité ». Elle n'a pas de valeur numérique.

2. Imprécision

C'est l'inverse de la précision, estimée par l'écart-type ou le coefficient de variation des résultats d'une série de mesures de répétabilité ou de reproductibilité.

3. Erreur aléatoire

Résultat d'un mesurage moins la moyenne d'un nombre infini de mesurages du même mesurande effectués dans les conditions de répétabilité.
L'erreur aléatoire est égale à l'erreur moins l'erreur systématique.

1. Éviter l'emploi du terme « précision » et préférer celui de répétabilité et de reproductibilité en raison des confusions possibles dans l'utilisation de ce terme.

Comme on ne peut effectuer un nombre infini de mesurages, il est seulement possible de déterminer une estimation à l'erreur aléatoire.

4. Répétabilité

Expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyses.

5. Reproductibilité

Expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée dans diverses conditions qui doivent être définies. La reproductibilité intralaboratoire est calculée dans un même laboratoire, à partir des résultats des aliquotes d'un même spécimen, distribuées au hasard dans les séries d'analyse de spécimens de patients (reproductibilité intrasérielle) soit « dans la journée », soit « jour après jour », soit en fonction des séries pendant plusieurs jours consécutifs (reproductibilité intersérielle).

B. Évaluation [24]

1. Protocole

a) Répétabilité

Effectuer dans la même série (ou dans n séries différentes) 20 fois de suite l'analyse d'un même spécimen dans des conditions standardisées (même opérateur, même lot de réactif, même calibrage…).

b) Répétabilité moyenne

Effectuer, en double, dans 20 séries différentes l'analyse d'un même spécimen.

c) Reproductibilité

Effectuer dans au moins 15 séries différentes l'analyse d'un spécimen.
Les spécimens seront placés en début de série et en fin de série de façon à évaluer le phénomène de dérive. La reproductibilité doit être étudiée sur des spécimens, choisis en fonction de leurs spécifications.
Une série est définie comme un ensemble de mesures consécutives effectuées sans interruption et dont les résultats sont obtenus à partir d'une phase unique de calibrage.

2. Spécimens

Ils sont choisis en fonction de chaque analyte en tenant compte de leur stabilité, de leur niveau de concentration et de l'identité de leur comportement par rapport aux spécimens biologiques analysés.
Ils correspondent soit à des aliquotes d'un même spécimen (congelées par exemple) soit à des spécimens stabilisés ou lyophilisés.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - x_2)^2}{2n}}$$

$$\nu = n$$

Quel que soit le mode de calcul de l'écart-type, le coefficient de variation (CV) ou écart-type relatif ($S_{relatif}$) est calculé grâce à la formule :

$$CV\,\% = \frac{S}{m} \times 100 \quad \text{ou} \quad S_{relatif} = \frac{s}{m}$$

La moyenne (m) représente le quotient de la somme des observations par leur nombre. Sauf indication contraire, le terme « moyenne » désigne la valeur arithmétique.

d) Estimation de la reproductibilité de série à série (ou de jour à jour)

Calculer la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des 15 séries indépendamment effectuées, en exploitant les formules suivantes :

$$m = \frac{\sum x}{n} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n-1}} \qquad \nu = n - 1$$

L'écart-type n'est représentatif de la dispersion des résultats, exprimée par l'intervalle m ± 1,96 s correspondant à 95 % de l'effectif, que dans la mesure où l'erreur est de type aléatoire et donc qu'un histogramme préalablement construit aura montré une distribution gaussienne.

e) Représentation graphique et interprétation

■ *Valeur de l'écart-type ou du coefficient de variation*

Pour chaque type d'évaluation (répétabilité, répétabilité moyenne, reproductibilité) et pour chaque spécimen, la valeur de l'écart-type ou du coefficient de variation (CV) peut être reportée sur un graphe (*fig. 1*) et comparée à des valeurs limites, en tenant compte de l'intervalle de confiance de l'écart-type ou du CV calculé. Le CV est représenté sur un graphe accompagné de son intervalle de confiance (IC).

■ *Intervalle de confiance de l'écart-type*

Pour un effectif n > 30 :

$$IC_s = s \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{2n}}$$

où

- t = coefficient à rechercher dans la table de Student en fonction du nombre de ddl et du risque α choisi ;
- s = écart-type des valeurs ;
- n = effectif retenu (n > 30).

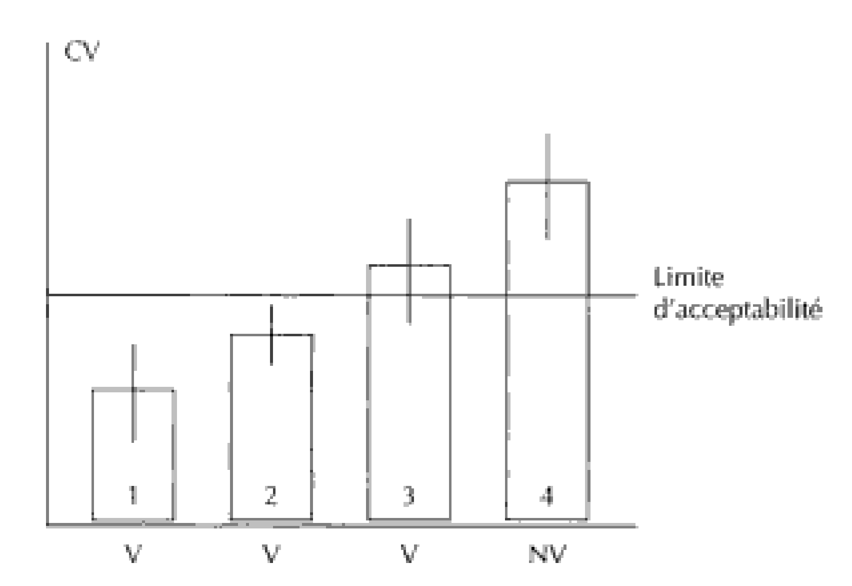


Figure 1. Coefficient de variation (CV) accompagné de son intervalle de confiance (NV = non validé, V = validé par rapport aux critères)

4. Exemple : évaluation de la répétabilité et de la reproductibilité d'une technique de dosage de la créatinine

Au cours de 15 séries de dosages, l'écart-type et le coefficient de variation des valeurs observées de créatinine de trois spécimens de contrôle (13, M, E) de niveaux de concentration différents (respectivement 73, 160 et 569 µmol/L) sont calculés pour estimer la reproductibilité et la répétabilité moyenne de la technique. Les coefficients de variation observés pour la répétabilité moyenne et la reproductibilité sont comparés aux limites d'acceptabilité en vigueur et ainsi jugés inférieurs aux limites établies dans le protocole de la SFBC (*tab. 1*, *fig. 2*).

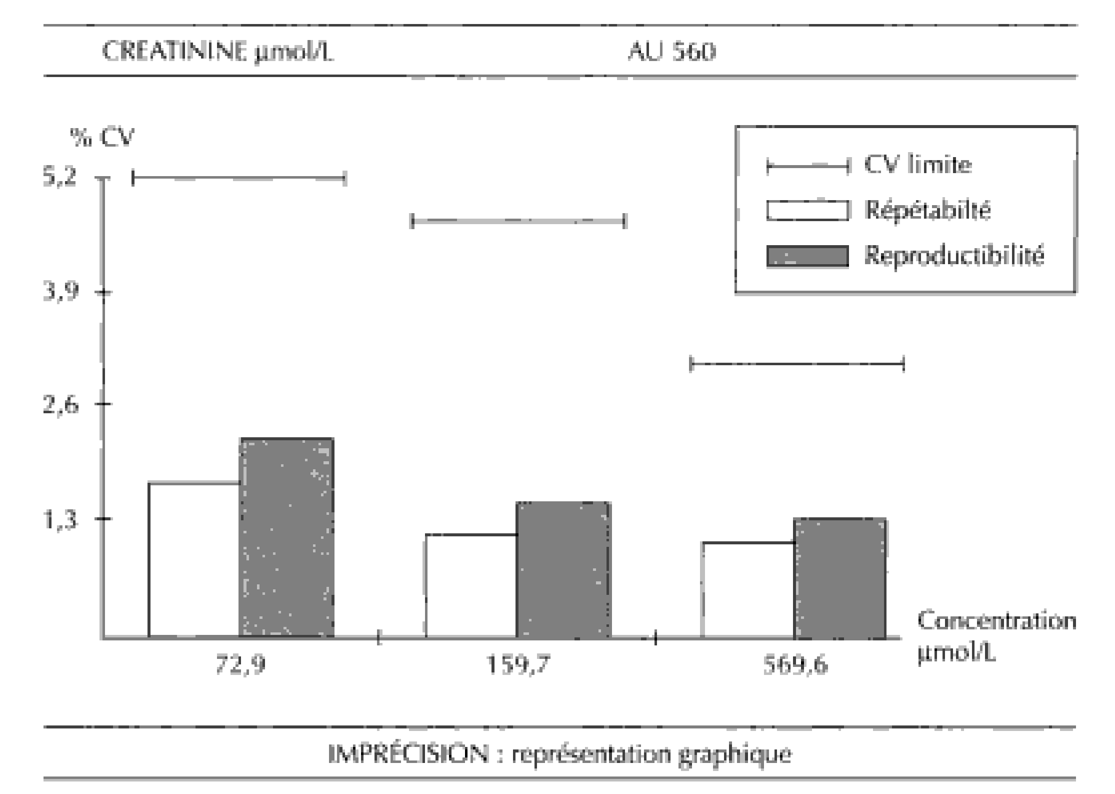


Figure 2. Répétabilité et reproductibilité pour trois niveaux de concentration. Sont également représentées les limites acceptables. Représentation réalisée avec le logiciel Mac Valtec

Tableau 1. Dosage de la créatinine. Évaluation de la répétabilité moyenne et de la reproductibilité de la technique testée

	B	B'	Δ (B-B')	M	M'	Δ (M-M')	E	E'	Δ (E-E')
Série 1	71	72	1	156	158	2	571	564	7
Série 2	71	69	2	162	161	1	571	575	4
Série 3	74	73	1	161	163	2	558	564	6
Série 4	72	75	3	161	159	6	572	565	7
Série 5	74	73	1	158	158	0	561	561	0
Série 6	76	73	3	163	160	3	566	578	12
Série 7	72	74	1	163	161	2	582	582	0
Série 8	73	71	2	159	161	2	565	574	9
Série 9	72	73	1	161	157	4	558	569	11
Série 10	71	71	0	158	159	1	561	572	11
Série 11	74	74	0	157	161	4	570	572	4
Série 12	75	74	1	157	157	0	560	569	9
Série 13	73	73	0	163	165	2	583	581	2
Série 14	73	76	3	155	161	6	572	582	10
Série 15	74	72	2	158	159	1	574	556	18
n	15	15		15	15		15	15	
m	73	72,9		160	160		568	570	
Variance (V)	2,3	3,0		7,3	4,8		63,2	63,2	
Moyenne des V	2,65			6,05			63,2		
n	30		15	30		15	30		15
m	73		73	160		160	569		569
s	1,62		1,22	2,45		2,13	7,95		6,14
ICs	± 0,42		± 0,44	± 0,63		± 0,86	± 2,5		± 2,5
CV	2,2		1,7	1,5		1,3	1,4		1,1
ICCV	± 0,5 %		± 0,6	± 0,4		± 0,55	± 0,45		± 0,44
CV limite répétabilité			3,5 %			3,0 %			2,0 %
CV limite reproductibilité	4,0 %			3,6 %			2,4 %		
Conclusions	VALIDE		VALIDE	VALIDE		VALIDE	VALIDE		VALIDE

II. Justesse

A. Définitions [17, 23]

1. Justesse

Elle est définie par l'étroitesse de l'accord entre la valeur vraie de la grandeur à mesurer et la moyenne des résultats qui serait obtenue en appliquant le procédé expérimental un grand nombre de fois de façon à réduire les erreurs aléatoires. Les sources d'erreur systématique ou de biais peuvent provenir de l'erreur de calibrage et de variations des caractéristiques physicochimiques du composé à mesurer, ou de l'influence de facteurs qui interfèrent sur la mesure. La *figure 3* permet de situer l'erreur de justesse (erreur systématique) par rapport à l'erreur de précision (reproductibilité).

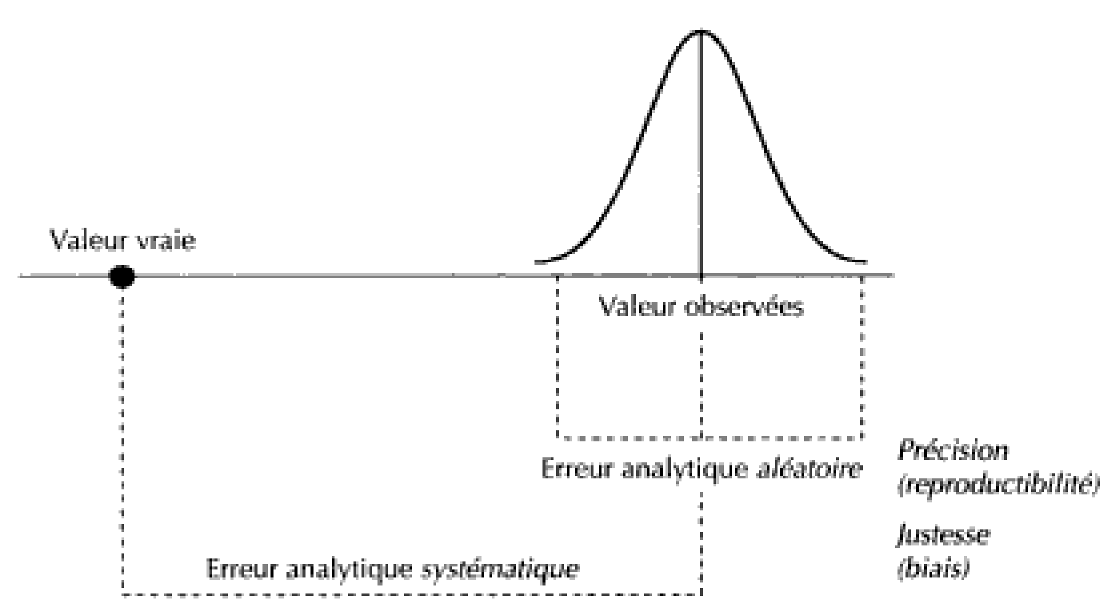


Figure 3. Représentation graphique : erreur de reproductibilité et erreur de justesse

La justesse correspond à un critère de qualité définissant une technique, anciennement nommée exactitude.
D'après les définitions internationales actuellement en vigueur, le terme d'exactitude doit être réservé à la caractérisation de la qualité d'un résultat.

2. Erreur systématique

Moyenne qui résulterait d'un nombre infini de mesurages du même mesurande effectués dans des conditions de répétabilité moins une valeur vraie du mesurande.
L'erreur systématique est égale à l'erreur moins l'erreur aléatoire.
Comme la valeur vraie, l'erreur systématique et ses causes ne peuvent être connues complètement.

11. Étalon secondaire

C'est une solution, de composition chimique et physico-chimique adaptée au système analytique auquel il est destiné et titrée par une technique de référence ou de validation étalonnée par un étalon primaire.
Un étalon secondaire devrait se comporter comme un spécimen biologique. Lorsque ces étalons secondaires sont titrés par une technique de référence, ils font partie du matériel de référence. Ce sont des solutions proches des liquides biologiques, soit des sérums d'origine animale ou humaine stabilisés par lyophilisation ou addition de conservateur, soit des solutions artificielles contenant le (ou les) composants à doser introduits par pesée, et des protéines (ou des substances comme la polyvinylpyrrolidone) destinées à donner à la solution une viscosité et une tension superficielle comparables à celle du plasma.

B. Évaluation [24]

La justesse doit être évaluée indépendamment de l'erreur aléatoire (précision) estimée par la dispersion des résultats observés autour d'une valeur moyenne. Lorsque l'erreur de justesse est inférieure à l'erreur aléatoire, il faudra répéter les dosages un grand nombre de fois pour mettre en évidence une différence de justesse entre deux méthodes.

1. Étude de solutions de référence ou de spécimens de contrôle

a) Protocole

Les spécimens sont dosés de façon répétée dans un minimum de 15 séries, de façon à calculer la moyenne représentative des résultats observés. La moyenne ainsi calculée est comparée à la valeur vraie (titre attribué à la solution de référence ou au spécimen de contrôle).
La différence observée correspond au biais.
Le biais ne doit pas être supérieur à des limites définies pour chaque analyte en tenant compte de l'intervalle de confiance de la moyenne qui tient compte du nombre de valeurs utilisées dans le calcul de la moyenne (nombre de degrés de liberté et risque α). Cette différence peut être exprimée en pourcentage de la moyenne, ce qui permet une appréciation de la nature de l'erreur, si l'on dispose de plusieurs spécimens de contrôle ou de référence présentant des niveaux de concentration différents.

b) Calculs

Moyenne :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

Intervalle de confiance de la moyenne :

$$IC_m = m \pm t.\frac{s}{\sqrt{n}}$$

c) Exemple : évaluation de la justesse d'une technique de dosage du cholestérol par l'étude de spécimens de contrôle titrés

D'après le protocole de validation de techniques de la SFBC [24], le biais est calculé pour trois spécimens de contrôle choisis à des niveaux de décision clinique (B, M et E).
Ces spécimens de contrôle sont analysés en double dans 15 séries indépendantes. La moyenne des valeurs observées est rapportée dans le *tableau 2* et comparée à la valeur cible de référence. Le biais calculé exprimé en concentration et en pourcentage est comparé aux limites d'erreur de justesse en tenant compte de l'intervalle de confiance de la moyenne.
Cette analyse permet de mettre en évidence les erreurs systématiques (affectant d'une erreur de même signe tous les spécimens analysés) d'ordre proportionnel (dépendant de la concentration de l'analyse) ou constant (indépendant du niveau de la concentration de l'analyte à doser).

Tableau 2. Exemple : évaluation de la justesse d'une technique de dosage du cholestérol par l'étude de spécimens titrés

		B	M	E
Valeur de référence cible	(mmol/L)	2,5	5,8	9,1
Technique testée moyenne	(mmol/L)	3,0	7,1	10,7
IC de la moyenne	(mmol/L)	± 0,04	± 0,07	0,12
Biais	(mmol/L) %	+ 0,5 + 20 %	+ 1,3 + 22 %	+ 1,6 + 17 %
Limite acceptable de justesse	% (mmol/L)	± 4 % ± 0,1	± 4 % ± 0,30	± 4 % ± 0,45
Conclusion		NV*	NV*	NV*

NV* : non validé par rapport au critère présence d'une erreur systématique proportionnelle à la concentration.

2. Étude de spécimens biologiques : comparaison de techniques

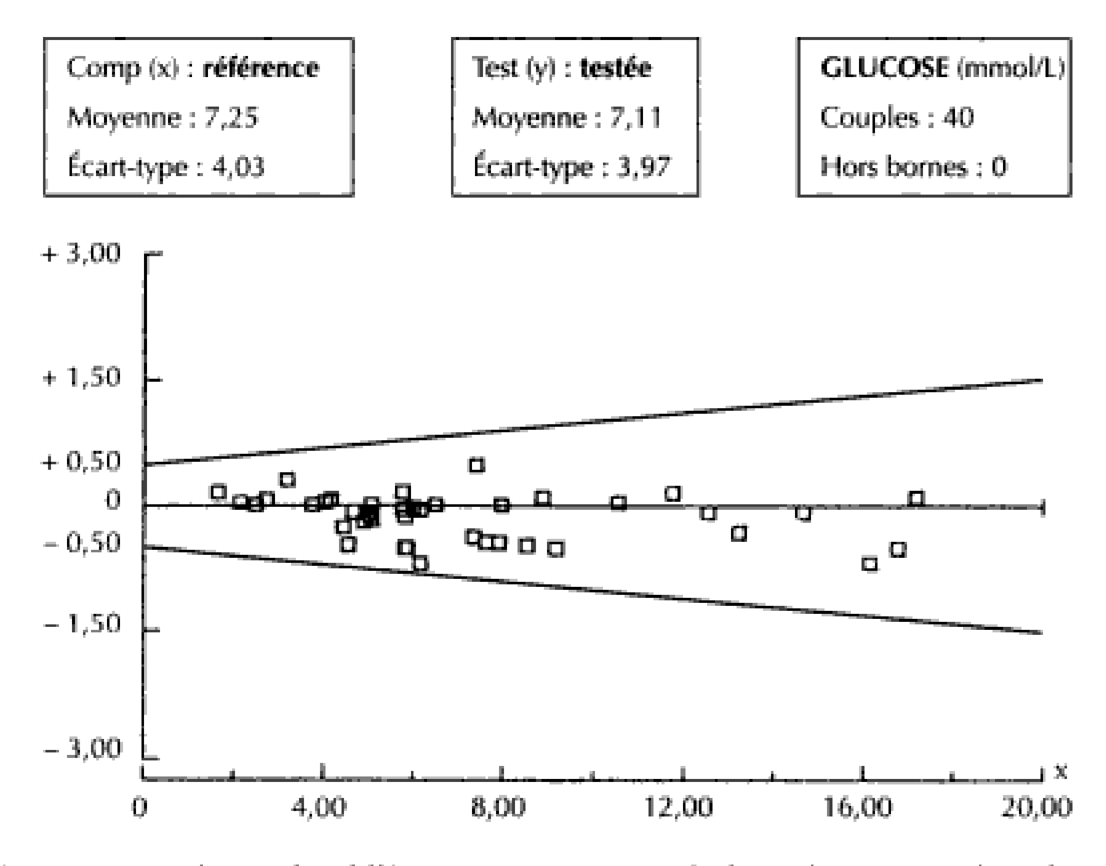
Elle consiste à analyser les différences observées entre les résultats d'une technique A par rapport à une technique B. Elle prend toute sa dimension lorsque l'une des deux techniques est une technique de référence ou une technique de validation.

a) Protocole

■ *Choix de la technique de comparaison*

Elle est utilisée comme référence de justesse. Si cela est possible, une technique de référence ou une technique de validation ou sélectionnée sera retenue. À défaut, la technique réputée la plus fiable dans l'état actuel de l'art, c'est-à-dire une technique déjà étudiée présentant une justesse et une spécificité reconnues ainsi qu'une reproductibilité satisfaisante, peut être choisie.
Très souvent, lorsqu'il s'agit d'un essai destiné à la substitution d'une technique par une autre, c'est la technique habituellement pratiquée par le laboratoire qui représente la technique de comparaison. Dans les conclusions, il faut tenir compte de ce facteur.

Les différences observées entre les résultats de la technique B et ceux de la technique A (en fonction de la concentration des spécimens) sont représentées sur la *figure* 5. Toutes les différences sont comprises à l'intérieur des limites préétablies [18].



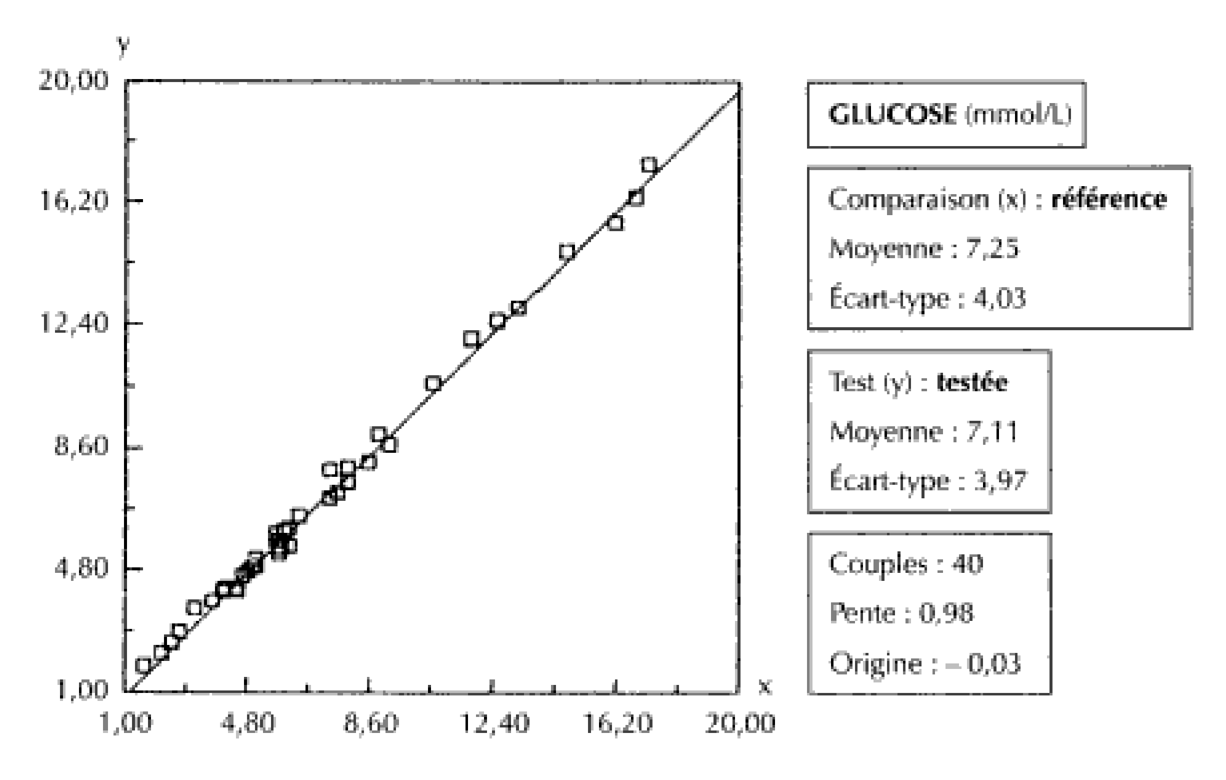
Représentation graphique des différences ($y_i - x_i$) entre résultats obtenus avec la technique de référence (en ordonnées) en fonction des résultats obtenus avec la technique de référence (en abscisses) – Logiciel Mac Valtec [9].

Figure 5. Évaluation d'une technique de dosage du glucose plasmatique

La relation liant les résultats de la technique A et ceux de la technique B est représentée dans la *figure* 6. Elle est traduite par la droite de régression des moindres rectangles y = 0,98x – 0,03 calculée comme indiqué précédemment.

$$b = \frac{3,97}{4,03} = 0,98 \quad \text{et} \quad a = 7,11 - (0,98 \times 7,25) = -0,03$$

L'examen de la *figure* 6 permet de vérifier la répartition des valeurs de x et de y et le comportement des différents spécimens choisis.
L'erreur systématique est caractérisée et estimée à partir de l'équation de la droite en tenant compte de l'intervalle de confiance de la pente et de l'ordonnée à l'origine [24].
Dans l'exemple d'évaluation choisi, les résultats de la technique A et ceux de la technique B ne diffèrent pas d'une valeur supérieure aux limites établies dans le protocole SFBC [24].
Remarque : le coefficient de corrélation linéaire, très utilisé dans ce domaine, n'est pas un test statistique destiné à juger de la qualité de la liaison entre deux techniques de dosage réputées doser le même analyte [2, 4]. C'est un test destiné à juger



Représentation graphique de la droite des moindres rectangles – Logiciel Mac Valtec [9].

Figure 6. Comparaison de deux techniques de dosage du glucose

de l'indépendance de deux variables aléatoires gaussiennes. La seule question à laquelle ce test peut répondre (à supposer que les variables soient distribuées de façon gaussienne) est la suivante : existe-t-il ou n'existe-t-il pas un lien entre la technique A et la technique B ? Question à laquelle le biologiste aura répondu avant même le début de l'essai.

III. Spécificité – Interférences – Perturbations

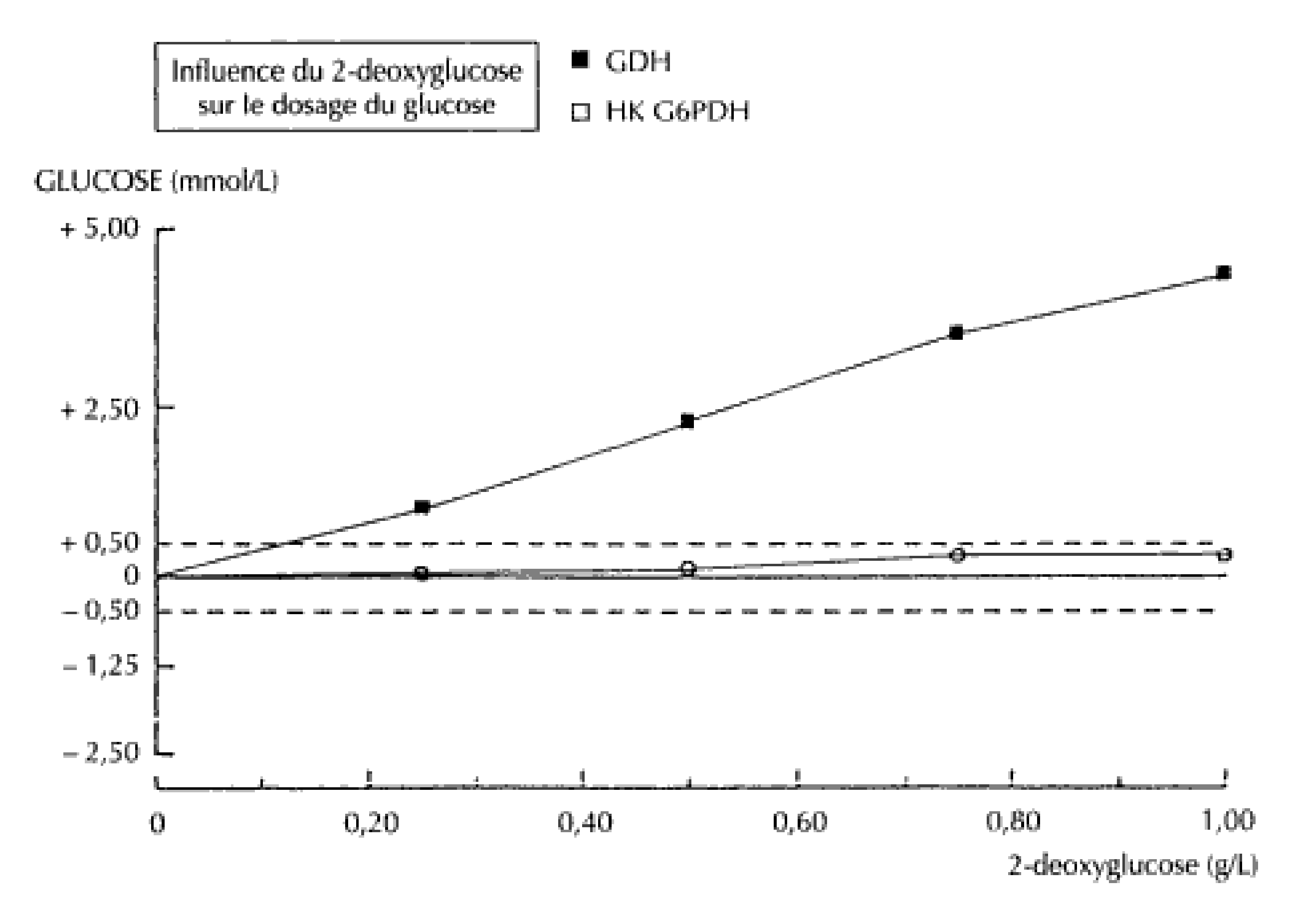
A. Définitions [23]

1. Spécificité chimique, spécificité

Propriété que présente une méthode analytique de pouvoir déterminer sélectivement la concentration du ou des composants qu'elle est supposée mesurer.

2. Perturbation (interférence)

Modification du signal mesuré, relative à une concentration déterminée, par suite de la présence d'une substance accompagnant l'analyte dans le milieu soumis à l'analyse, modifiant l'exactitude des résultats.
Cet effet est à distinguer du manque de spécificité.



En ordonnée, sont représentées les différences entre la concentration initiale et la concentration obtenues pour chaque taux de surcharge, en abscisse, la concentration de 2-déoxyglucose.

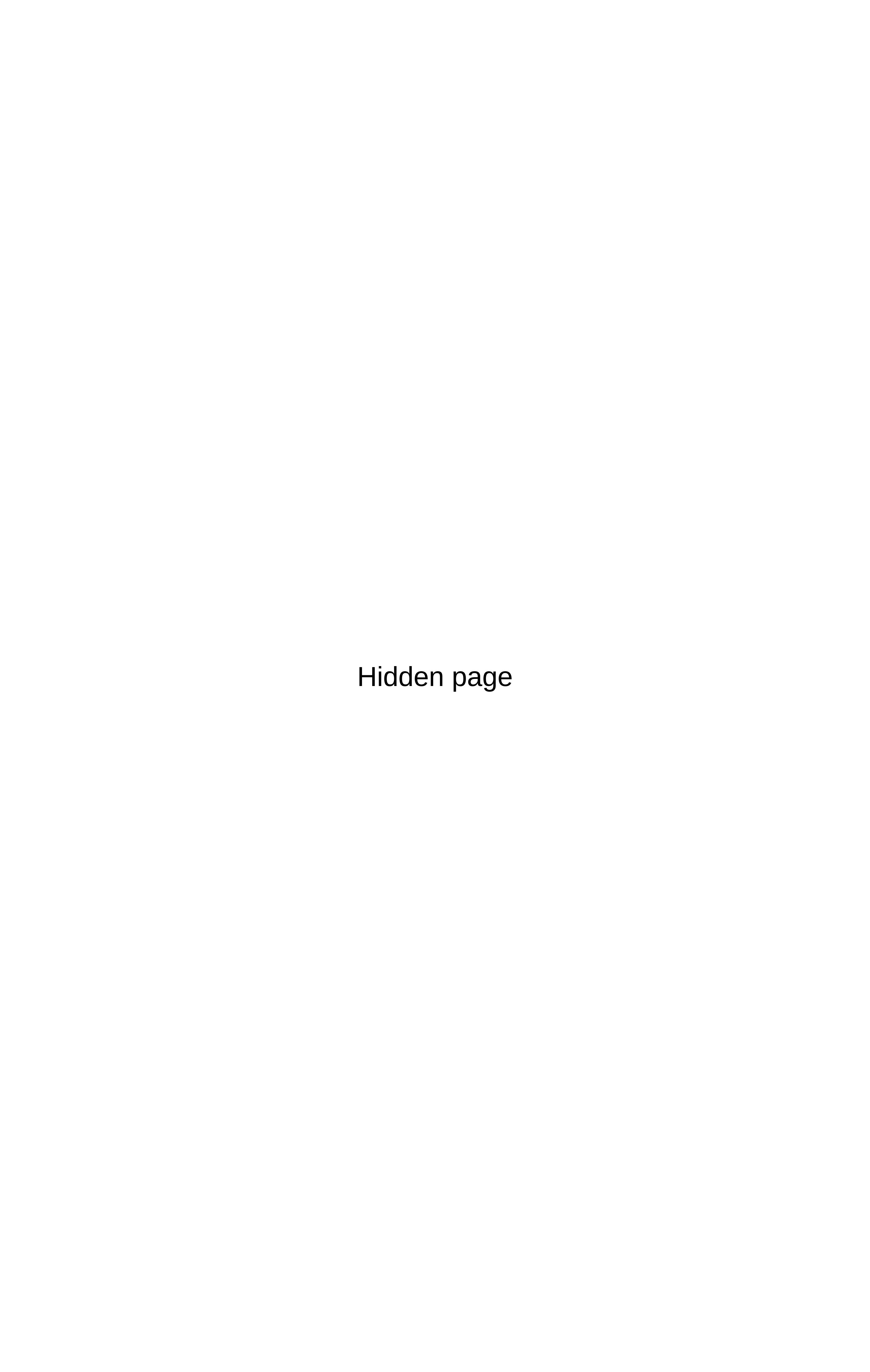
Figure 7. Évaluation de la spécificité d'une technique de dosage du glucose plasmatique vis-à-vis du 2-déoxyglucose. Représentation graphique Mac Valtec [9]

b) Sensibilité à des interférences

Étude de l'interférence de la bilirubine sur le dosage de l'acide urique par une technique enzymatique utilisant l'uricase et la peroxydase. Des concentrations croissantes de bilirubine sont ajoutées à un sérum présentant une concentration d'acide urique moyenne (520 µmol/L). Les résultass obtenus sont présentés dans le *tableau 5* et représentés dans la *figure 8*.

Tableau 5. Résultats observés pour le dosage de l'acide urique par une technique utilisant l'uricase et la peroxydase sur des spécimens surchargés en bilirubine (0 à 500 µmol/L)

	1	2	3	4	5	6	7
Surcharge bilirubine (µmol/L)	0	25	50	100	250	375	500
Acide urique (µmol/L)	520	515	508	505	485	465	455
Δ	0	– 5	– 12	– 15	– 35	– 55	– 65


Hidden page

3. Limite de quantification (limite basse de linéarité)

Valeur la plus basse du résultat d'une mesure qui peut être obtenue par un procédé de mesure donné et qui peut être fourni avec une incertitude donnée.

B. Évaluation

1. Protocole

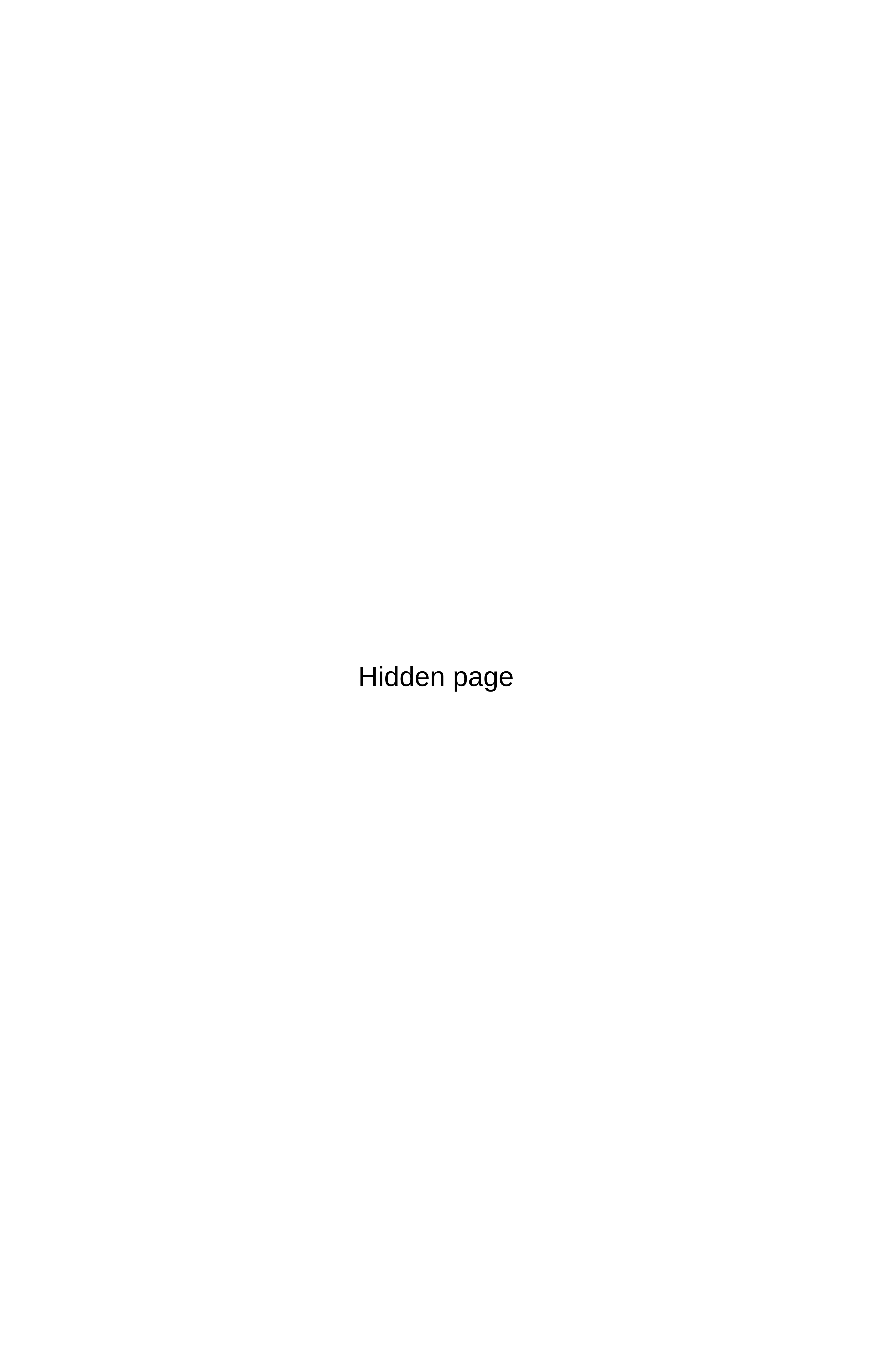
Les limites haute et basse du domaine d'analyse sont évaluées à partir du dosage effectué sur une gamme de spécimens préparés soit à partir de solutions aqueuses concentrées, soit à partir d'un spécimen de concentration élevé après dilution dans un diluant approprié.
Chaque point de gamme est analysé trois fois, éventuellement dans trois séries indépendantes dans des conditions extrêmes de conservation des réactifs.

2. Calculs

Les résultats obtenus sont reportés sur un graphe $y_i = f(x_i)$ où y_i représente la moyenne des valeurs observées pour chaque dilution et x_i la dilution. L'examen visuel de cette relation permet une appréciation déjà satisfaisante des limites de linéarité haute et basse de la technique étudiée.
Le calcul de la droite de régression des moindres carrés $y = f(x)$ peut être exploitée dans la mesure où les valeurs de x sont connues sans erreur.
La gamme retenue pour cette évaluation doit couvrir toute l'étendue du domaine d'analyse.
Le résultat observé pour chaque point de la gamme est ensuite exprimé en pourcentage de la valeur de la solution mère et reporté sur un graphe en fonction de la dilution effectuée. La partie rectiligne de la courbe correspond à la zone de linéarité à l'intérieur de laquelle les résultats sont interprétables.

3. Exemple

Étude du domaine d'analyse d'une technique de dosage de la CRP (*C-reactive protein*).
Des dilutions successives d'un spécimen de concentration élevée de CRP dans une solution d'albumine ne contenant pas de CRP sont dosées par la technique évaluée. La limite basse de linéarité est atteinte lorsque la concentration de CRP est inférieure à 20 mg/L et la limite haute de linéarité à 80 mg/L (*fig. 9*).


Hidden page

VII. Limites d'acceptabilité

A. Définition [27]

Les *critères d'acceptabilité* sont les critères selon lesquels les performances d'une technique sont jugées satisfaisantes dans les conditions d'emploi définies par l'utilisateur (ces critères s'appuient en particulier sur les concepts d'imprécision, d'inexactitude et d'erreur totale acceptable).

B. Évaluation

Les limites d'acceptabilité varient en fonction de l'analyte considéré et peuvent être exprimées en termes de limites d'erreur de reproductibilité, limite d'erreur de justesse et limites d'erreur d'exactitude.
Différents critères de jugement ont été proposés pour établir des limites d'acceptabilité en matière de performance analytique. Elles reposent sur différentes approches :

1. l'intervalle des valeurs de référence (prise en compte de la variation biologique interindividuelle et de la variation analytique),
2. l'opinion des cliniciens,
3. l'état de l'art,
4. les variations biologiques interindividuelles et intra-individuelles.

1. Intervalle de référence

Les qualités d'une technique de dosage doivent être telles qu'elles permettent à cette technique de distinguer un résultat « normal » d'un résultat pathologique. Les techniques devront, de ce fait, présenter une précision d'autant plus performante que l'intervalle des valeurs de référence est étroit. Certains auteurs [21] estiment que les limites tolérables d'erreur (2CV analytiques) en termes de pourcentage doivent être inférieures à : $\frac{\text{1/4 intervalle de référence}}{\text{moyenne de l'intervalle de référence}}$.

Cependant, d'une part, la valeur 1/4 est donnée de façon empirique et, d'autre part, l'intervalle de référence dépend de la population étudiée, de la technique statistique utilisée et des performances analytiques de la technique ; mais cette approche est simple et les valeurs de référence existent pour tous les paramètres.

2. Opinions des cliniciens

Elles sont générées par des informations rapportées à des changements se produisant dans des situations cliniques bien définies. Ces changements ne sont pas seulement dus à des variations analytiques, mais le plus souvent résultent des variations préanalytiques.
Les exigences des cliniciens varient avec leur spécialisation [8], leur cursus, leur expérience, leurs conditions d'exercice et, de plus, elles varient en fonction des

performances des laboratoires avec lesquels ils travaillent habituellement et restent très empiriques.

3. État de l'art

L'état de l'art représente les performances analytiques réalisées, à un moment donné, dans un certain nombre de laboratoires ; il est, en général, établi à partir des résultats des programmes de contrôle de qualité intra et/ou inter-laboratoires. Le niveau de performance atteint par un certain nombre de laboratoires parmi ceux qui fournissent les meilleurs résultats (20 % ou 50 % selon les auteurs) pourrait constituer un objectif à atteindre pour tous. C'est l'approche proposée par la SFBC dans le protocole de validation de techniques [24, 27].
C'est une approche pragmatique et facile à définir à condition que les spécimens de contrôle utilisés se comportent comme des spécimens biologiques.

4. Variations biologiques intra-individuelles

Lorsqu'on dose un analyte biologique, la variabilité des résultats obtenus inclut les facteurs de variations :

- préanalytiques dues, par exemple, à la technique de prélèvement, à la position du patient pendant celui-ci, à la durée de stockage et de la centrifugation du spécimen, etc. ;
- analytiques engendrées par l'imprécision et le biais ;
- biologiques (intra et/ou interindividuelles).

De façon à mettre en évidence des variations anormales chez un même individu, ou par rapport à un groupe d'individus choisis comme référence, il est nécessaire de disposer d'une technique dont l'erreur analytique est inférieure à la variation biologique. Par exemple, certains auteurs ont proposé que l'imprécision analytique acceptable exprimée en termes de coefficient de variation corresponde à la moitié du coefficient de variation observé pour la variation biologique intra-individuelle [10]. C'est une approche dont le modèle est simple et en relation avec la physiopathologie, mais la fraction 1/2 est totalement arbitraire. Cette approche conduit très souvent à des spécifications plus strictes que celles qui sont réalisables avec les techniques actuellement disponibles et de ce fait ne peuvent être considérées que comme des objectifs à long terme.

L'essentiel de la question

La fiabilité des résultats des analyses effectuées dans les laboratoires dépend largement de la qualité des techniques de mesure utilisées.

Objet

Le document a pour objet de décrire les différents critères permettant de définir la qualité d'une technique de mesure. Chacun des critères est évalué en faisant appel à un protocole expérimental illustré par un exemple.
Le document fournit également les outils statistiques nécessaires pour interpréter les résultats obtenus et valider la technique en fonction des limites d'acceptabilité en vigueur.

Domaine d'application
Les critères et leur évaluation s'appliquent aux techniques destinées aux analyses de biologie médicale essentiellement aux techniques de mesure quantitatives

Définitions
Une partie du chapitre est consacrée à la définition internationale des termes utilisés dans le domaine de la qualité et de la métrologie pour uniformiser les vocabulaires. Les principaux critères étudiés concernent : la reproductibilité et la répétabilité, les limites de linéarité, le seuil de détection, la justesse et la sensibilité aux interférences.

Protocoles expérimentaux
Les protocoles expérimentaux destinés à l'évaluation de la reproductibilité, de la justesse, des limites de linéarité, du seuil de détection et de l'influence des substances susceptibles d'interférer sont décrits. Chaque protocole est illustré par un exemple chiffré pour guider l'utilisateur dans sa démarche et permettre une interprétation judicieuse des résultats.
Les protocoles sont modulaires et peuvent faire l'objet d'évaluation partielle en fonction des particularités des techniques. Seuls les essais conduits dans des conditions habituelles d'application de la technique peuvent fournir des informations exploitables dans le cadre de la pratique courante.

Validation
Les résultats obtenus sont jugés en fonction des limites d'acceptabilité en vigueur. La validation préalable des techniques d'analyse constitue l'un des outils essentiels de l'assurance qualité des laboratoires.

Pour en savoir plus

- 1. AFNOR. Gérer et assurer la qualité, tome 1 : Concepts et terminologie ; tome 2 : Management et assurance de la qualité, 5[e] éd., 1994.
- 2. Auget J.-L., Maccario J. Mésusages du coefficient de corrélation linéaire dans la comparaison de deux méthodes. RBM 1981 ; 3 (3) : 187-92.
- 3. Baud M., Cohen R., Dumont G., Mercier M, Naudin C, Vassault A et al. et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC. Évaluation de la limite de détection. Inf Sci Biol 1989 ; 15 (3) : 157-63.
- 4. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinial measurement. The Lancet 1986 ; 307-10.
- 5. Bondon M., Grafmeyer D., Later R., Ekindjian O.G., Vassault A., Bienvenu J. et les membres des commissions Protéines et Validation de techniques de la SFBC. Proposition d'une technique de validation pour le dosage des protéines totales sériques et plasmatiques. Inf Sci Biol 1986 ; 12 (6) : 443-50.
- 6. Deming W.E. Statistical Adjustment of Data. New York, Dover Publication, 1938.
- 7. Dreux C., Metais P., Bailly M., Barbe M., Dubos G., Houot O. et les membres de la commission Méthodes de référence de la SFBC. Méthodes de référence et méthodes sélectionnées en biochimie clinique. Ann Biol Clin 1976 ; 34 : 235-8.
- 8. Elion Gerritzen W.E. Analytic precision in clinical chemistry and clinical decisions. Am J Clin Pathol 1980 ; 73 : 183-95.
- 9. Eynard J.C., Grafmeyer D. Protocole « Validation de techniques ». Exploitation des données par le logiciel Mac Valtec. Inf Sci Biol 1987 ; 3 : 216-7.
- 10. Fraser C.G. Analytical goals are applicable to all. JIFCC 1990 ; 2 (2) : 84-6.

- 11. Gerhardt M.F., Myara A., Cam G., Vassault A., Trivin F. et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC. Proposition d'une technique de validation pour le dosage de la bilirubine totale et conjuguée sérique et plasmatique. Inf Sci Biol 1988 ; 14 (4) : 319-27.
- 12. Haeckel R., Romer M., Sonntag O., Vassault A., Naudin C. Recommendations for the multicentre evaluation of analytical systems in clinical chemistry, in Haeckel R. (ed.) Evaluation method in laboratory medicine. Weinheim, New York, Bâle, Cambridge, VCH, 1993 : 47-69.
- 13. ISCH. Recommandations for measurement of serurn iron in human blood. Br J Hae matol 1978 ; 38 : 291.
- 14. Morin J.-F., Codet P., Moineau M.-P., Morin P.-P. Comparaison de techniques de dosages : le logiciel Compar. Immunoanal Biol Spec 1990 ; 23 : 37-44.
- 15. Neese J., Duncan P., Bayse D. et al. Development and evaluation of a hexokinase/glucose6phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose référence method. HEW Publication No (CDC), 1976.
- 16. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085). Evaluation protocols, 1989.
- 17. Organisation internationale de normalisation (ISO) Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie. ISO. Genève, 1993.
- 18. Passing H., Bablok W.A. A new medical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983 ; 21 : 709-20.
- 19. Sholler R. Comparaison de deux méthodes de dosage, in Contrôle de qualité en hormonologie, tome I : Stéroïdes urinaires. Paris, SEPE, 1977 : 123-45.
- 20. Tessier G. La relation d'allométrie : sa signification statistique et biologique. Biometrics 1948 ; 4 : 1-14.
- 21. Tonks D.B. A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadians laboratories. Clin Chem 1963 ; 9 : 217-33.
- 22. Valdiguie P. (président), Albert A., Artur Y., Balian P., Duffaut M., Dumont G. et al. (commission Valeur séméiologique des examens de laboratoire de la SFBC). Valeur diagnostique d'une analyse biologique (document B). Inf Sci Biol 1986 ; 12 (2) : 108-12.
- 23. Vassault A., Mollard J.-F., Naudin C., Dumont G., Azzedine M.-C., Bailly M. et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC. Dictionnaire des termes à l'usage de la validation de techniques (glossaire) (document A). Ann Biol Clin 1986 ; 44 : 679-85.
- 24. Vassault A., Grafmeyer D., Naudin C., Dumont G., Bailly M., Henny J . et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC. Protocole de validation de techniques (document B). Ann Biol Clin 1986 ; 44 : 686-745.
- 25. Vassault A., Grafmeyer D., Naudin C., Dumont G., Bailly M., Henny J. et al. et les membres de la commission Validation de techniques de la SFBC. Définition et description d'une technique de validation (document C). Ann Biol Clin 1986 ; 44 : 746-55.
- 26. Vassault A., Baud M., Castanier M., Dumont G., Ingrand J., Mercier M. et al. Recommandations pour la comparaison de techniques (document F). Ann Biol Clin 1992 ; 50 : 727-30.
- 27. Vassault A., Grafmeyer D., De Graeve J., Cohen R., Beaudonnet A., Bienvenu J. Spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. Ann Biol Clin 1999 ; 57 : 685-95.
- 28. York D. Least-squares fitting of a straight line. Can J Phys 1966 ; 44 : 1079-86.

Rayonnements émis par les principaux radio-isotopes utilisés en pratique médicale : décroissance radioactive, unités, détection

J. GUÉCHOT, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

IV. Interactions des particules et rayonnements avec la matière (rappels)

A. Les particules β^-
B. Particules $\beta+$
C. Photons γ et X

V. Détection des rayonnements

A. Détecteurs utilisant l'ionisation
B. Détecteurs utilisant l'excitation
C. Dénombrement des rayonnements
D. Statistique de comptage
E. Autres utilisations des détecteurs

La radioactivité est la transformation spontanée d'un noyau atomique au cours de laquelle ce dernier émet un rayonnement.
La radioactivité a été découverte par H. Becquerel en 1896 à l'occasion de recherches sur les rayonnements X, mis en évidence peu de temps auparavant par W.C. Röntgen. C'est en 1898 que Marie Curie proposa le terme de « radioactivité » à la suite de sa découverte, avec P. Curie et G. Bémont, de l'existence du radium.
La découverte de la radioactivité artificielle en 1934 par Irène et Frédéric Joliot-Curie a été à l'origine de nombreuses applications. Plus particulièrement, l'émergence d'une discipline médicale, la médecine nucléaire, a consacré le large développement des applications médicales et biologiques des radioéléments artificiels.
L'intérêt des radio-isotopes tient à la possibilité de détecter avec une bonne précision des quantités infimes de matière. Après administration sous forme de molécules d'intérêt biologique, ils peuvent être détectés au sein de l'organisme et donner des renseignements morphologiques ou fonctionnels sur de nombreux organes ou systèmes physiologiques. In vitro, *l'utilisation des traceurs radioactifs a permis le développement spectaculaire des méthodes radio-immunologiques. Les effets biologiques des rayonnements émis par les radioéléments sont utilisés en thérapeutique, principalement pour détruire des cellules cancéreuses. Enfin, les radio-isotopes sont des instruments d'étude indispensables en recherche parce qu'ils permettent l'analyse de phénomènes moléculaires avec une grande sensibilité et une grande précision.*

I. Rappel de la structure du noyau atomique

Un atome est un ensemble électriquement neutre caractérisé par le nombre d'électrons (Z) qui gravitent autour du noyau et par le nombre (A) de nucléons qui constituent son noyau.

A. Nucléons

Les A nucléons sont répartis en Z protons et A – Z neutrons. Ces nucléons sont soumis à deux types de forces :
- des forces électrostatiques répulsives qui agissent entre les protons ;
- des forces non électrostatiques, attractives, d'origine nucléaire qui agissent entre les nucléons et qui leur confèrent une énergie de liaison W (énergie qu'il serait nécessaire de dépenser pour séparer les nucléons les uns des autres).

B. Nomenclature

Un noyau peut être caractérisé par la présentation suivante :

$$^{A}_{Z}X$$

où X est le symbole chimique de l'élément,
A est le nombre de masse (= nombre de nucléons),
Z est le numéro atomique (= nombre de protons),
Rq. le nombre de neutrons : $N = A - Z$.

La *figure 1* montre que les noyaux stables sont limités à une zone étroite et limitée vers le haut. Celle-ci est appelée ligne de stabilité β :
- les noyaux des éléments situés à gauche de cette ligne de stabilité ont un excès de neutrons ;
- les noyaux des éléments situés à droite de cette ligne de stabilité ont un excès de protons ;
- les noyaux des éléments situés au-dessus de la ligne de stabilité ont un excès de protons et de neutrons.

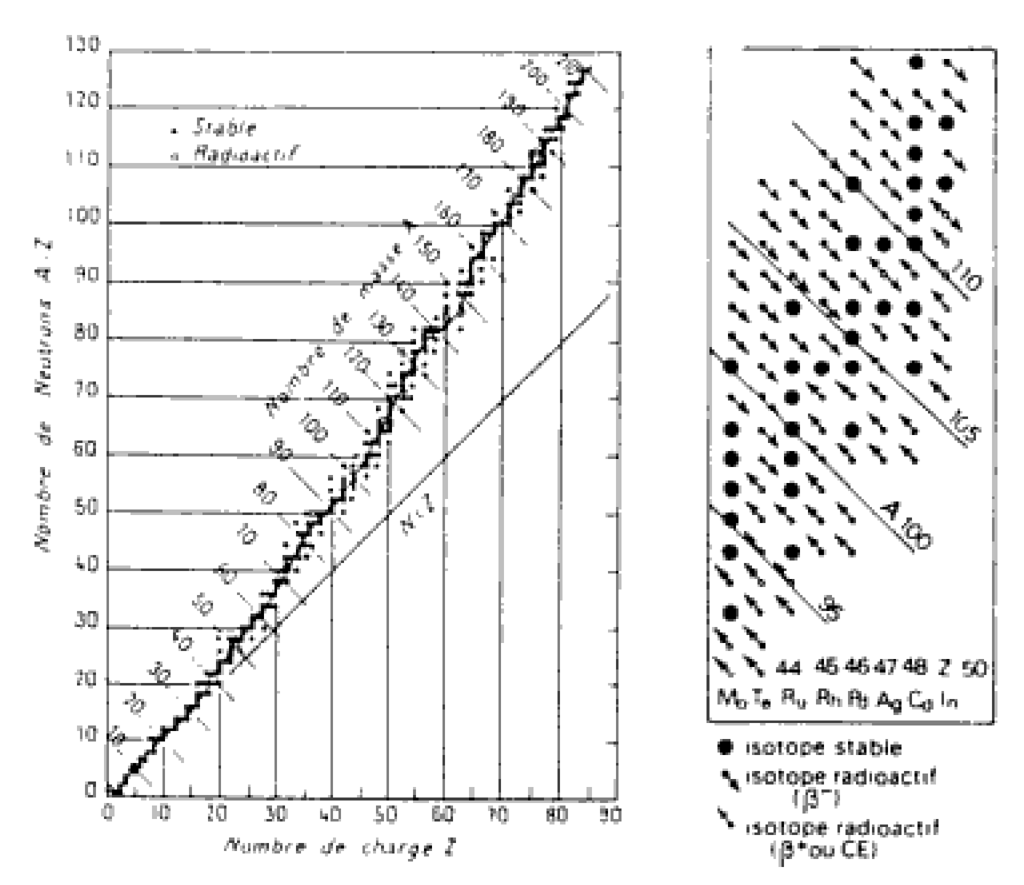


Figure 1. Nombre de neutrons (A–Z) en fonction du numéro atomique (Z = nombre de protons). Les isotopes d'un même élément sont placés sur une droite verticale

II. Transformations radioactives

Les noyaux des éléments situés dans l'une des trois régions d'instabilité ont tendance à se transformer de manière à revenir vers la zone de stabilité. Selon la région dans laquelle se situe l'élément, il est possible de distinguer trois types de transformations radioactives : les transformations isobariques, l'émission α et la fission.

A. Transformations isobariques

Un noyau trop riche en neutrons ou en protons se transforme en noyau stable sans changer de masse (A reste identique).

deux particules. Deux photons d'énergie égale à 511 keV (énergie correspondant à la masse de l'électron) sont alors émis en coïncidence, à 180° l'un de l'autre. Ce phénomène permet la détection de la radioactivité β^+.

2. Capture électronique

$$p + e^- \rightarrow n + \nu$$

ou $${}^{A}_{Z}X + e^- \rightarrow {}^{A}_{Z-1}Y + \nu$$

Exemple : $${}^{55}_{26}Fe + e^- \rightarrow {}^{55}_{25}Mn + \nu$$

Au cours de la transformation, il y a intégration au noyau d'un électron périphérique (généralement de la couche électronique K) et transformation d'un proton en neutron avec émission d'un neutrino.
L'atome fils se trouve, après transformation, dans un état excité. Le réarrangement du cortège électronique donne lieu à l'émission d'énergie :
- soit sous forme de photons : un spectre de raies d'émission X, caractéristique de l'élément formé lors de la désintégration, accompagne la capture électronique ;
- soit sous forme d'électrons Auger : un spectre de raies d'électrons Auger émis avec une faible énergie peut aussi accompagner la capture électronique.

D. Émission α et fission spontanée

Les noyaux qui possèdent un excès de protons et de neutrons sont dynamiquement instables et tendent à évoluer vers un état de plus grande stabilité par émission de particule α ou par fission spontanée.

1. Émission α

Deux neutrons et deux protons sont expulsés du noyau sous la forme d'un noyau d'hélium : He ou particule α.

$${}^{A}_{Z}X \rightarrow {}^{A-4}_{Z-2}Y + {}^{4}_{2}He$$

Exemple : $${}^{226}_{88}Ra \rightarrow {}^{222}_{86}YRn + {}^{4}_{2}He$$

L'émission α s'observe pour les éléments lourds (Z > 82), mais aussi pour le ^{147}Sm et quelques radioéléments artificiels de la même région du tableau de Mendeleïev. L'énergie libérée n'est pas totalement emportée par la particule α. L'émission α provoque un recul du noyau et :

$$E = E_\alpha + E_R$$

avec $$E_\alpha = E_M/(M + m)$$

et $$E_R = E_m/(M + m)$$

où : M = masse du noyau,
m = masse de la particule α.

B. Loi de décroissance radioactive

La loi de décroissance radioactive, explicitée par Rutherford et Soddy en 1902, exprime en fonction du temps la variation du nombre d'atomes radioactif.

Soit N un grand nombre d'atomes radioactifs présents à l'instant t. Chacun a une probabilité λ de se désintégrer. Pendant l'intervalle de temps dt, le nombre d'atomes qui se désintègrent est donné par :

$$-\,dN = \lambda.N.dt$$

qui peut s'écrire sous la forme de l'équation différentielle :

$$-\frac{dN}{N} = \lambda.dt$$

L'intégration de l'équation s'écrit :

$$\int \frac{dN}{N} = -\int \lambda.dt + Cte$$

$$\ln \frac{N}{C} = -\,\lambda t$$

(avec C = constante d'intégration)

d'où $$N = C.e^{-\lambda t}$$

À l'instant $t = 0$, il y a N_0 atomes d'où $C = N_0$

donc $$N = N_0.e^{-\lambda t}$$

Le nombre d'atomes décroît donc exponentiellement avec le temps (*fig.* 3).

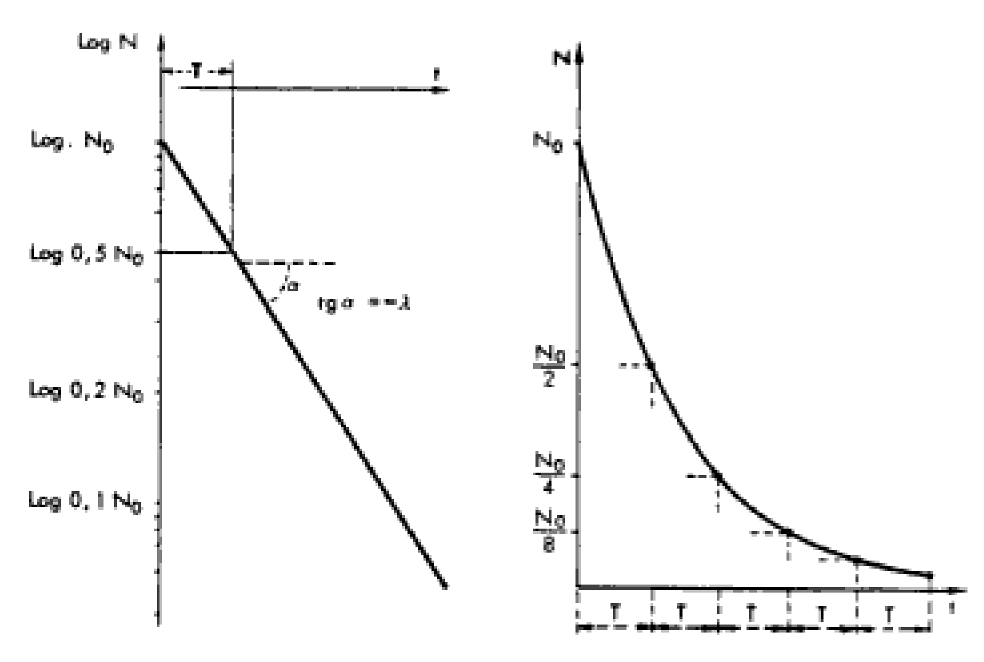


Figure 3. Courbe de décroissance radioactive en fonction du temps. La variation exponentielle de N peut être linéarisée en coordonnées semi-logarithmiques (à gauche)

• photons X et γ,
• électrons de conversion interne,
• neutrons.

Les radio-isotopes qui se désintègrent par émission α ou par fission n'étant pas utilisés en médecine, les effets des rayonnements qu'ils produisent ne sont pas abordés ici.

Seul un rappel succinct du devenir dans la matière des particules β^-, β^+ et des photons X et γ est présenté.

A. Les particules β^-

Les particules β^- sont des électrons qui ne sont pas monoénergétiques mais dont l'énergie est distribuée selon un spectre caractéristique du nucléide (*fig. 5*). Une interaction est un processus par lequel l'énergie et/ou la direction de la particule sont modifiées.

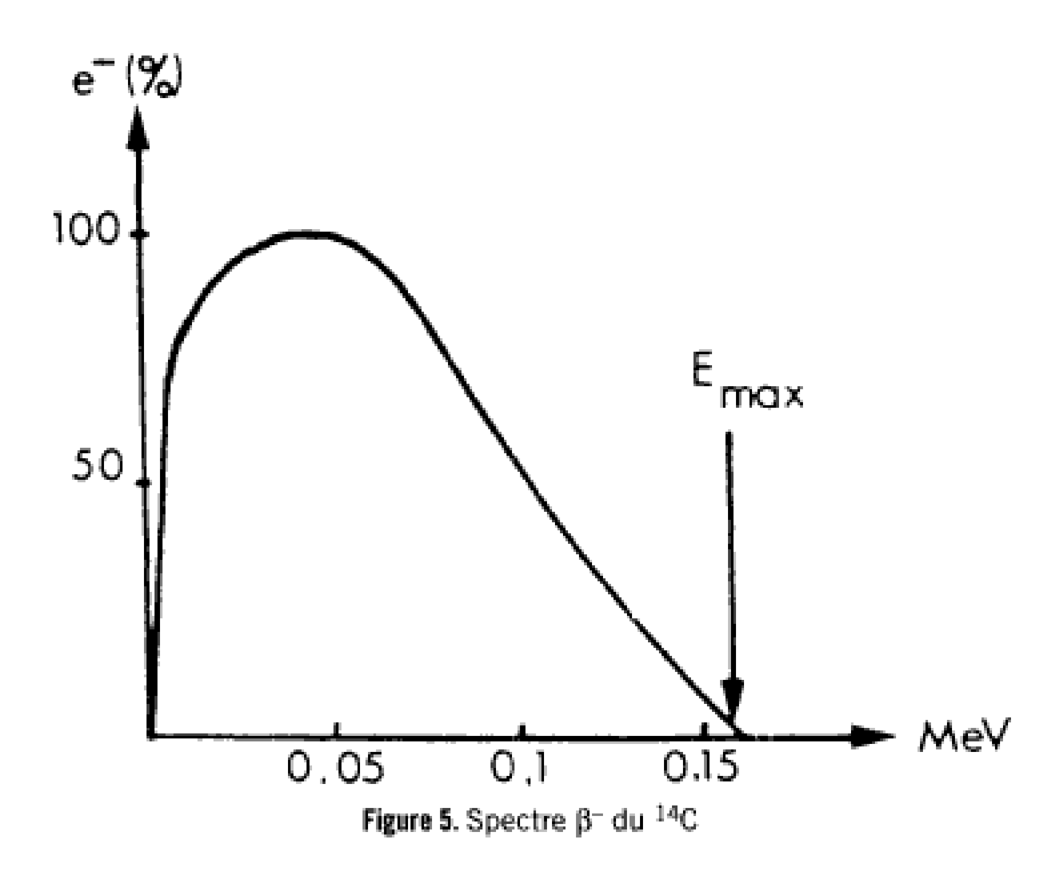


Figure 5. Spectre β^- du ^{14}C

1. Parcours dans la matière

Les électrons, particules légères, subissent au cours de leur déplacement dans la matière un grand nombre de collisions avec de faibles pertes d'énergie. De plus, en raison de la diffusion coulombienne, leur parcours est particulièrement accidenté. Dans l'air, le parcours des β^- va de quelques millimètres à quelques dizaines de mètres selon leur énergie (le parcours maximum du β^- émis par le tritium est de l'ordre de 5 millimètres).

Le parcours des β^- varie approximativement en raison inverse de la densité de la matière parcourue (le parcours maximum du β^- du tritium est d'environ 6 µm dans l'eau et 2 µm dans l'aluminium).

Les positons (β^+) ne se distinguent des négatons (e^-) que par le signe de leur charge électrique. Les phénomènes observés sont par conséquent identiques à ceux dus aux émissions β^-.
La différence essentielle réside dans le fait que, lorsque l'énergie de la particule β^+ est tombée à une valeur très faible (< 1 eV), elle s'annihile en rencontrant un électron. Les deux charges s'annulent et les deux masses sont converties en énergie sous forme de deux photons γ, émis à 180° dans des directions opposées, et d'énergie équivalente (511 keV).

C. Photons γ et X

Les photons γ et X sont des rayonnements électromagnétiques. La différence essentielle qui les caractérise réside dans leur mode de production. Les photons X sont émis lors de réarrangements du cortège électronique de l'atome (rayonnements de fluorescence), alors que les photons γ sont émis lors de la désexcitation du noyau de l'atome. Dans les deux cas, le spectre d'énergie est un spectre de raies caractéristiques.

1. Interactions avec la matière

L'énergie des photons est cédée à la matière qu'ils traversent selon trois mécanismes qui peuvent intervenir au cours de deux types d'interactions :
- interaction avec diffusion : *effet Compton* ;
- interaction avec disparition :
  - *effet photoélectrique*,
  - *production de paires* (e^+, e^-).

a) Effet Compton (ou diffusion Compton)

Le photon heurte un électron atomique qui est éjecté de son orbite et projeté dans une direction déterminée (*fig.* 7). Le photon confère une partie de son énergie à l'électron, l'énergie résiduelle est diffusée sous forme d'un nouveau photon d'énergie plus faible.
L'électron éjecté provoque des excitations et des ionisations en dissipant son énergie dans le milieu. Le photon diffusé peut subir un nouvel effet Compton ou être absorbé par effet photoélectrique.

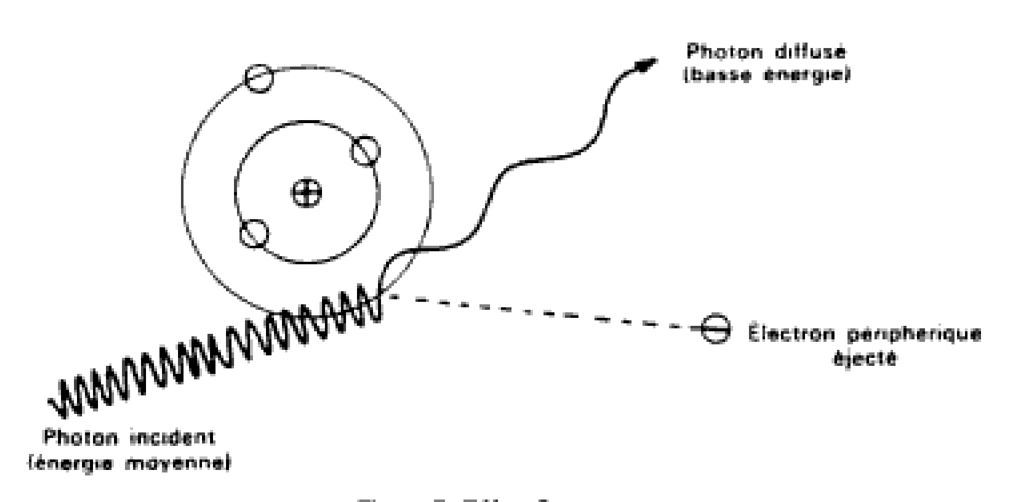


Figure 7. Effet Compton

1. Détecteurs à scintillation

Les compteurs à scintillation sont les détecteurs les plus utilisés pour les mesures de radioactivité lors des utilisations médicales des radioéléments.

a) Principe général

Un rayonnement traversant un scintillateur solide ou liquide provoque sur sa trajectoire l'excitation d'un certain nombre de molécules qui restituent l'énergie ainsi absorbée sous forme de photons lumineux.
Le nombre de molécules excitées est proportionnel à l'énergie dissipée par la particule. Le nombre de photons émis est donc lui aussi proportionnel à cette énergie.

b) Appareillage

Un détecteur à scintillation est composé d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur. Le scintillateur est constitué d'un solide ou d'un liquide au sein duquel ont lieu les phénomènes d'absorption de l'énergie de rayonnement et d'émission de photons.
Les scintillateurs solides, les plus utilisés, sont des cristaux d'iodure de sodium ou d'iodure de césium, activés au thallium. Ils sont caractérisés par un haut rendement de fluorescence et un pouvoir d'arrêt élevé, qui en font des détecteurs très efficaces pour mesurer les rayonnements γ, entre 100 et 400 keV.
Pour les photons de 511 keV (tomographie par émission de positon), d'autres cristaux sont utilisés : BGO : bismuth-germanate ; LSO: lutetium-oxyorthosilicate.
Les scintillateurs liquides sont constitués d'un solvant (dioxane, toluène, xylène ou dérivés) dans lequel sont mises en solution des substances fluorescentes (PPO et POPOP, par exemple) en faible concentration. La source dont on mesure la radioactivité (β^-) est placée dans le solvant. La particule incidente abandonne son énergie dans le solvant dont certaines molécules sont excitées. Cette excitation est transmise au soluté. L'émission du photon est finalement caractéristique du soluté bien que ses molécules soient en petit nombre. Le transfert d'énergie d'une molécule de solvant à une molécule de soluté se produit par fluorescence sensibilisée. Solvant et soluté sont choisis de telle sorte que le niveau d'excitation de la molécule de solvant soit supérieur ou égal au premier niveau excité de la molécule de soluté. D'autre part, le soluté est choisi de telle sorte que son spectre d'émission soit bien adapté à la photocathode, afin d'en obtenir le meilleur rendement possible. À cette fin, une seconde substance fluorescente (soluté secondaire) peut être introduite dans le mélange scintillant.
Le scintillateur est couplé optiquement à un tube photomultiplicateur composé d'une cellule photoélectrique qui transforme les photons émis par le scintillateur en électrons (par effet photoélectrique). Le courant ainsi obtenu est ensuite amplifié par un multiplicateur d'électron. L'intensité du courant collecté est finalement proportionnelle à l'énergie perdue par le rayonnement.
Les détecteurs à scintillation permettent de dénombrer les rayonnements et d'en mesurer l'énergie.

2. Détecteurs à semi-conducteurs

Les détecteurs à semi-conducteurs peuvent être assimilés à de petites chambres à ionisation solides.
Rappelons que l'on distingue deux types de semi-conducteurs :
- les semi-conducteurs de type N où prédominent les charges libres négatives. C'est le cas d'un cristal de silicium tétravalent contenant des impuretés pentavalentes (phosphore, arsenic, antimoine…). Un des électrons de l'atome pentavalent est libre ;
- les semi-conducteurs de type P où prédominent des « trous positifs ». C'est le cas d'un cristal de silicium contenant des impuretés trivalentes (aluminium, gallium, indium).

En accolant deux cristaux de type P et N, il apparaît, à la jonction PN, une zone où les porteurs de charge libre ont disparu et où règne un champ électrique élevé sur une épaisseur faible. Si l'on applique une différence de potentiel de même signe à la jonction (pôle positif sur N, pôle négatif sur P), cette zone augmente et constitue le volume du détecteur. Un rayonnement traversant la zone dépeuplée d'une jonction PN polarisée va créer de nombreuses paires électrons-trous. Les électrons se dirigent vers le pôle positif créant un courant électrique. Le nombre de paires est proportionnel à l'énergie perdue par la particule dans la jonction. L'amplitude du courant mesuré est donc proportionnelle à cette énergie.
Un détecteur à semi-conducteur permet donc d'obtenir deux informations : le comptage de particules et la mesure de l'énergie de ces particules. Ce sont des détecteurs qui permettent d'obtenir une excellente résolution en énergie.

C. Dénombrement des rayonnements

Dans un détecteur, l'effet physique observé dépend du nombre de particules qui y subissent une interaction. Or, toutes les particules émises par une source ne sont pas prises en compte. Le compteur ne peut recevoir qu'une partie des particules émises par une source radioactive pour des raisons purement géométriques. De plus, le rayonnement peut subir des interactions avec d'autres matériaux que le détecteur. Enfin, toutes les particules n'interagissent pas dans le détecteur.
La détermination d'une activité est donc difficile à réaliser de manière absolue et est réservée aux laboratoires de métrologie. En pratique, une activité se mesure de manière relative par rapport à l'activité d'une source-étalon dans des conditions expérimentales identiques.

D. Statistique de comptage

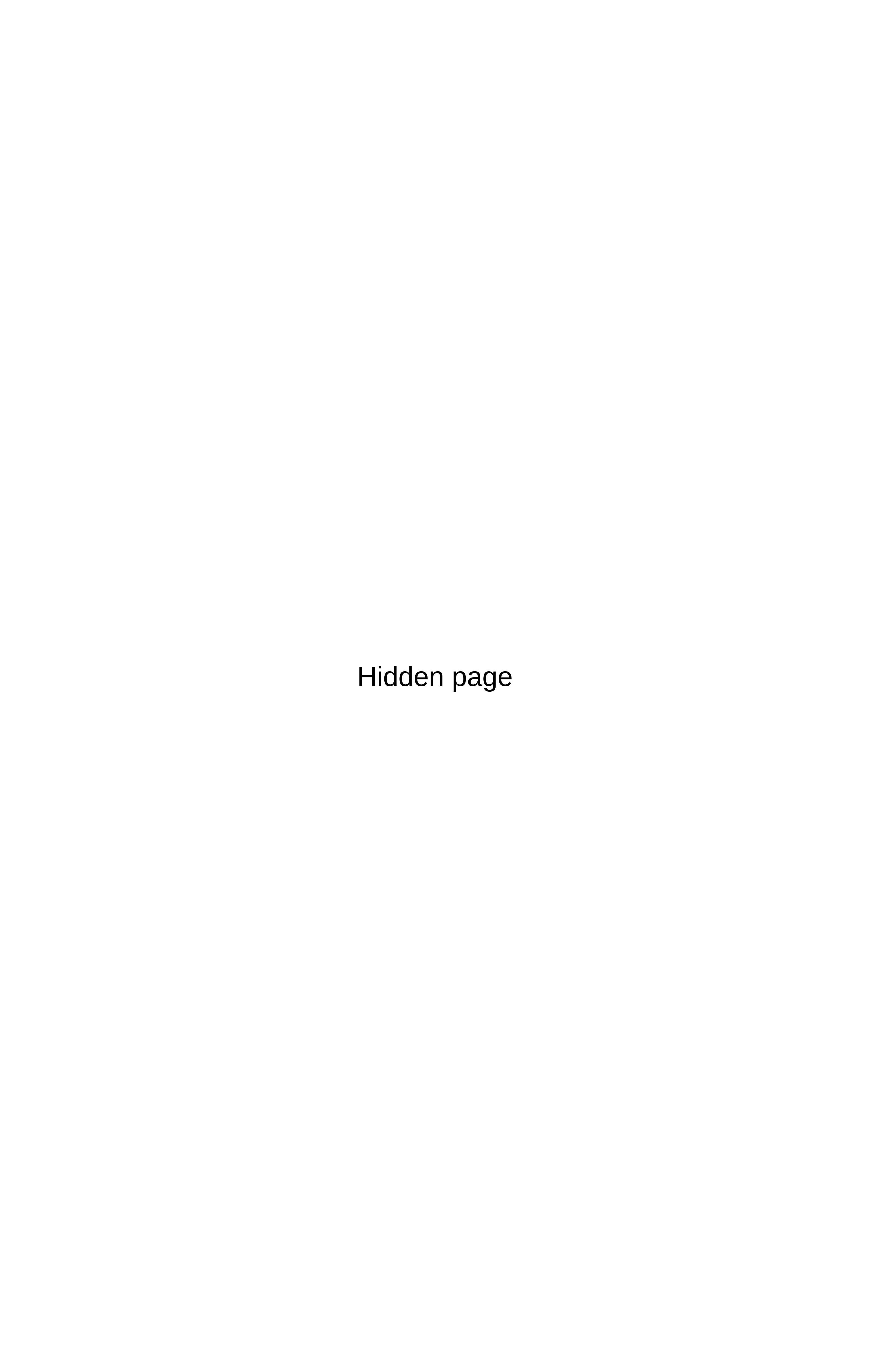
L'émission d'un rayonnement et son interaction avec la matière étant des phénomènes aléatoires, les lois qui les régissent sont des lois statistiques. Il est possible de démontrer expérimentalement que la fréquence de répartition des comptages successifs d'une même source radioactive se distribue selon une loi de Poisson centrée sur la moyenne des comptages.

Tableau 2. Quelques radio-isotopes utilisés en biologie et en médecine (diagnostic *in vivo*, diagnostic *in vitro*, radiothérapie)

Élément	Symbole	Nombre de masse (A)	Numéro atomique (Z)	Période (T)	Principales émissions (keV)	Production
Tritium	H	3	1	12,26 ans	β^- (18,5)	Réacteur
Carbone	C	11	6	20,5 min.	β^+ [2 γ (511)]	Cyclotron
Carbone	C	14	6	5 730 ans	β^- (156)	Réacteur
Azote	N	13	7	10 min.	β^+ [2 γ (511)]	Cyclotron
Oxygène	O	15	8	124 s	β^+ [2 γ (511)]	Cyclotron
Fluor	F	18	9	1,9 h	β^+ [2 γ (511)]	Cyclotron
Phosphore	P	32	15	14,3 j	β^- (1 710)	Réacteur
Soufre	S	35	16	87,9 j	β^- (167,3)	Réacteur
Chrome	Cr	51	24	27,8 j	γ (320)	Réacteur
Cobalt	Co	57	27	270,9 j	γ (122)	Cyclotron
Cobalt	Co	60	27	5,3 ans	β^- (319) γ (1 333) γ (1 173)	Réacteur
Technétium	Tc	99 m	43	6 h	γ (140)	Générateur
Indium	In	113 m	49	99,8 h	γ (392)	Générateur
Iode	I	123	53	13,3 h	γ (159)	Cyclotron
Iode	I	125	53	60,2 j	γ (35,5)	Réacteur
Iode	I	131	53	8,05 j	β^- (608) γ (364,5)	Réacteur
Césium	Cs	137	55	30 ans	γ (662)	Fission
Iridium	Ir	192	77	74 j	β^- (670) β^- (590) γ (317) γ (468)	Réacteur
Thallium	Ti	201	81	73 h	γ (75) γ (135)	Cyclotron



Statistiques


Hidden page

On peut définir en première approximation la statistique comme la science du dépouillement des données numériques fournies par l'enquête ou l'expérience. Son rôle est de nous renseigner sur la manière d'interpréter ces données, sur les moyens d'en améliorer la récolte et sur leur validité. Ce rôle est donc de critique et de prévision.

L'ensemble des données (mesures ou dénombrements) fournies par l'expérience ou l'observation, valeurs empiriques, constitue une série statistique.

L'étude peut porter sur un seul caractère, quantitatif (poids, âge, résultat d'un dosage, etc.) ou qualitatif (sexe, race, etc.). Il s'agit alors d'une série statistique simple ou à une dimension.

Mais elle peut aussi porter sur deux caractères considérés simultanément : par exemple, sexe et sensibilité à une maladie ; taille et poids d'un ensemble d'adultes, etc. Il s'agit alors d'une série statistique double ou à deux dimensions.

D'un autre point de vue, il y a lieu de distinguer deux types de séries statistiques : la population et l'échantillon :

- *la population est un ensemble souvent très grand d'unités, dont il est très rarement possible de faire une étude exhaustive par suite du coût de l'opération et parfois d'une impossibilité matérielle (un exemple d'étude de population est cependant constitué par le recensement périodique de la population française). Dans certains cas, la population est infinie et a un caractère fictif : c'est par exemple l'ensemble infini des dosages d'un analyte que l'on pourrait effectuer sur la même solution ;*
- *l'échantillon : puisque l'on renonce à faire une étude exhaustive de la population, on extrait de celle-ci un sous-ensemble de taille plus faible, appelé échantillon. À la condition que cet échantillon ait été extrait « correctement », il pourra être considéré comme représentatif de la population. En raison de sa petite taille, l'échantillon pourra être étudié complètement. De l'examen de cet échantillon, il est induit des propriétés de la population. C'est le jugement sur échantillon, but de la statistique inductive.*

Pour extraire « correctement » un échantillon de la population, il est important d'effectuer ce prélèvement selon une méthode objective ; le tirage au sort utilise des tables de nombres aléatoires ou tout autre procédé équivalent, de façon que tous les éléments de la population possèdent la même chance d'appartenir à l'échantillon. C'est une opération qui garantit la représentativité de l'échantillon, qualifié d'aléatoire.

I. Description d'un échantillon et estimation ponctuelle des paramètres de la population

La description d'un échantillon diffère selon la nature du caractère étudié.

A. Variable qualitative

1. Définitions

Pour une variable qualitative comportant k catégories exhaustives et s'excluant les unes les autres, chacune des N unités constituant la série statistique est classée dans une des catégories (on dit aussi modalités ou classes).
Désignons par n_1 l'effectif des unités classées dans la catégorie 1, …, n_i l'effectif de la catégorie i, …, n_k l'effectif de la catégorie k.
Les effectifs $n_1, \ldots, n_i, \ldots, n_k$ sont aussi appelés les fréquences absolues ; ils vérifient,

$$\sum_{i=1}^{i=k} n_i = N$$

Le rapport $f_i = \frac{n_i}{N}$ est la fréquence relative de la catégorie i ; les fréquences relatives $f_1, \ldots, f_i, \ldots, f_k$ sont des nombres compris entre 0 et 1 vérifiant :

$$\sum_{i=1}^{i=k} f_i = 1$$

Un cas particulier et fréquent est constitué par une variable qualitative à deux catégories, soit qu'il s'agisse d'un caractère dichotomique comme par exemple la présence ou l'absence d'une particularité chez chaque individu ou encore le sexe (masculin, féminin), soit qu'on ne s'intéresse qu'à l'étude d'une catégorie A parmi les k catégories de la variable étudiée, les k – 1 catégories autres que A étant regroupées et désignées par $\bar{A}$ (non A).
On écrit alors :

$$n_A + n_{\bar{A}} = N$$

$$f_A + f_{\bar{A}} = 1$$

Vis-à-vis du caractère A l'échantillon est décrit complètement par deux paramètres : sa taille N et la fréquence f_A (ou l'effectif n_A observé).

2. Estimation de la proportion de la catégorie A dans la population

L'échantillon étudié est supposé représentatif d'une population dont la proportion exacte p_A d'unités de la catégorie A caractérisant la population est évidemment inconnue. Compte tenu de la seule information dont on dispose, apportée par l'échantillon, l'estimation de p_A – notée $\hat{p}_A$ – qu'il faut interpréter comme un ordre de grandeur a pour valeur f_A. On écrit :

$$\text{estim. de } p_A = \hat{p}_A = f_A$$

Cette estimation ponctuelle (par un nombre) est d'autant plus précise que l'effectif N de l'échantillon est plus grand. Nous verrons ultérieurement qu'elle est complétée utilement par un intervalle de confiance.

Lorsqu'on dispose de plusieurs échantillons extraits d'une même population, la précision de l'estimation de p_A est améliorée en regroupant les informations apportées par les échantillons ; par exemple, avec deux échantillons E_1 et E_2 d'effectifs N_1 et N_2, les effectifs observés étant désignés par n_1^A et n_2^A pour la catégorie A, l'estimation,

$$\hat{p}_A = \frac{n_1^A + n_2^A}{N_1 + N_2} = \frac{N_1 f_1^A + N_2 f_2^A}{N_1 + N_2}$$

constitue une estimation plus précise que f_1^A ou f_2^A.
Cette remarque sera utilisée lors de la comparaison de deux pourcentages.

B. Variable quantitative

Dans le cas d'une variable quantitative, la série statistique se présente sous la forme de n valeurs individuelles empiriques $x_1, \ldots, x_n$. Il est utilisé deux paramètres principaux pour résumer l'ensemble des observations :

- un paramètre de tendance centrale, le plus utilisé est la moyenne arithmétique ;
- un paramètre de dispersion autour de la moyenne, le plus souvent la variance ou sa racine carrée appelée écart type.

Lorsque la série est un échantillon aléatoire d'une population, la distribution inconnue des valeurs individuelles de la variable x dans la population conditionne les possibilités d'utilisation des paramètres. Il est souvent émis l'hypothèse que cette variable x est répartie selon une loi de distribution théorique (loi de probabilité) de Laplace Gauss, dite normale, dont l'allure est rappelée ci-après (*fig. 1*).

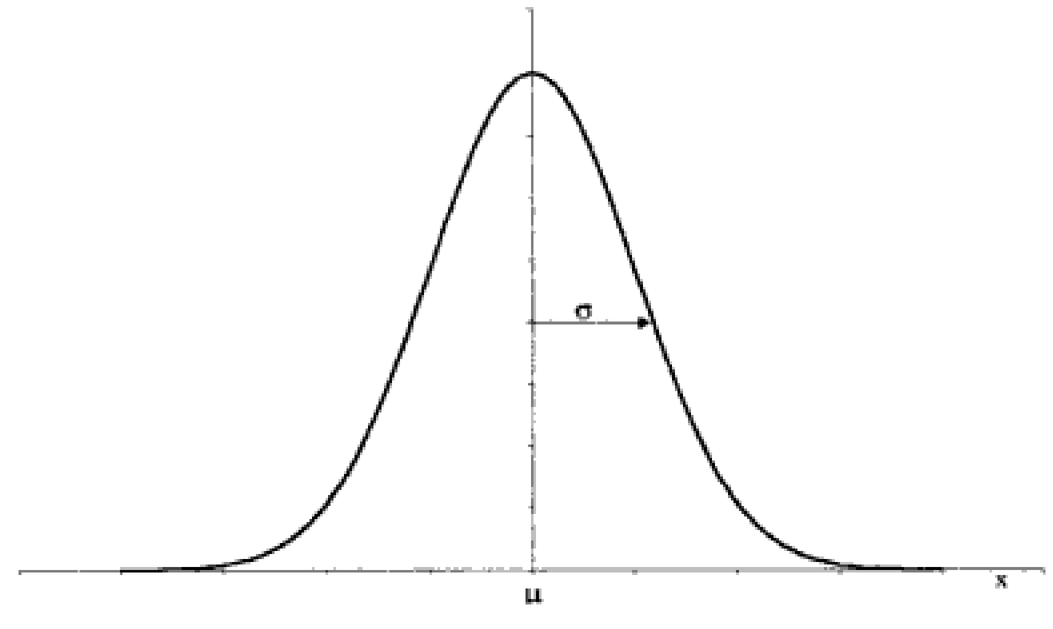


Figure 1. Loi normale

Il est intéressant de noter que cette loi, symétrique, ne dépend que de deux paramètres indépendants : μ appelé espérance mathématique en probabilité (autrement dit la moyenne de la loi) et σ l'écart type (la dispersion de x autour de la moyenne). La connaissance de la valeur de ces deux paramètres définit entièrement la population.

L'échantillon, « image en réduction » de la population, permet une estimation des paramètres μ et σ de celle-ci.

1. Estimation de la moyenne de la population

La moyenne arithmétique de l'échantillon, d'effectif n, est définie par,

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\sum x_i$ désigne la somme des valeurs individuelles des données.
Cette moyenne empirique est la meilleure estimation que l'on puisse faire de la moyenne μ inconnue de la population :

$$\text{estim. de } \mu = \hat{\mu} = \bar{x}$$

2. Estimation de la variance et de l'écart type ; coefficient de variation

a) Variance

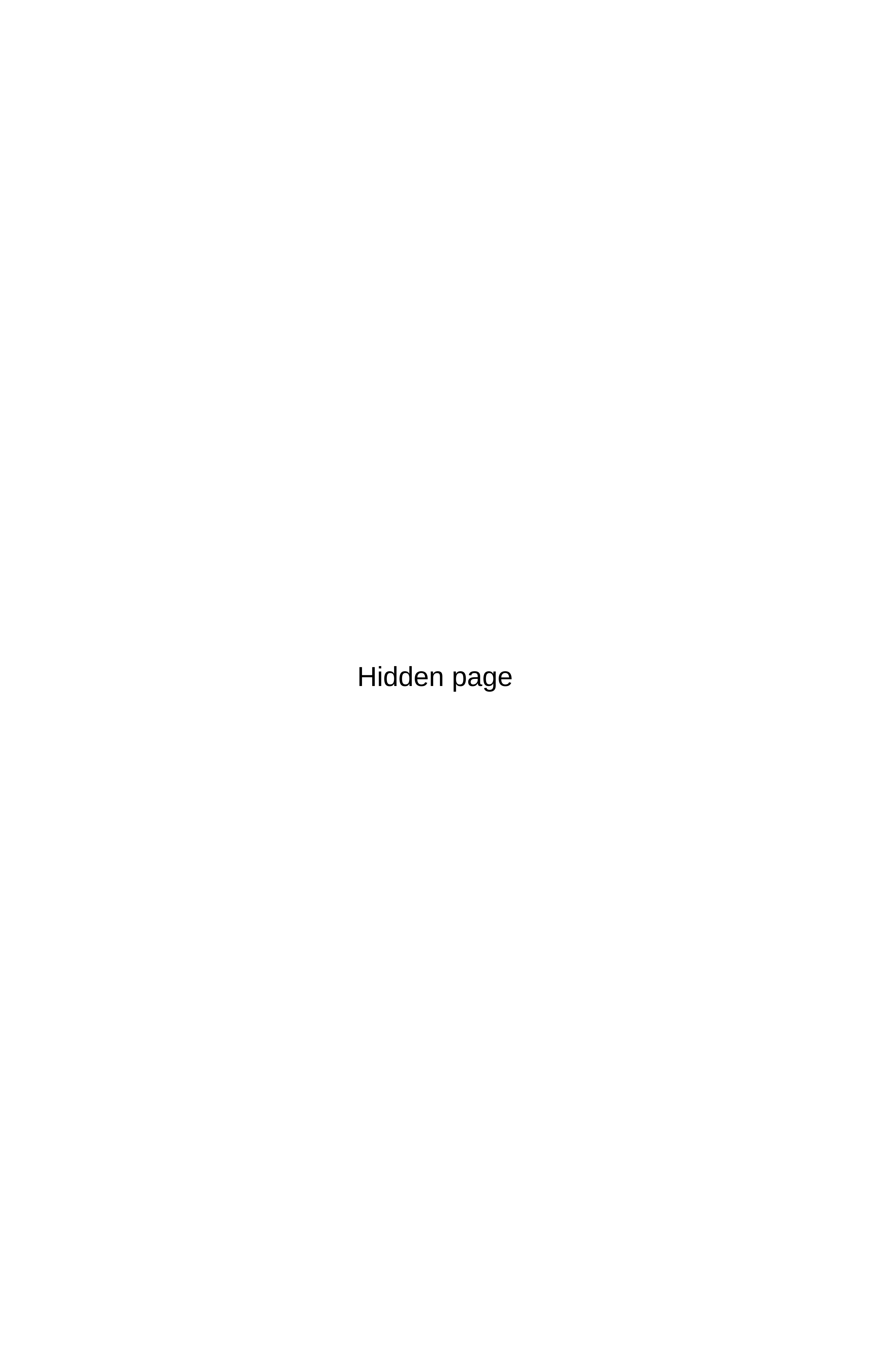
L'estimation de la variance σ^2 de la population à partir des données de l'échantillon, habituellement notée s^2, s'écrit :

$$\text{estim. de } \sigma^2 = s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{SCE}{ddl}$$

Dans cette expression, le numérateur $SCE = \sum (x_i - \bar{x})^2$ est la somme des carrés des écarts entre chaque valeur individuelle et la moyenne ; le dénominateur $n - 1$ est le nombre de degrés de liberté (ddl) associé à cette somme des carrés des écarts : il n'y a en effet que $n - 1$ écarts $x_i - \bar{x}$ indépendants puisqu'ils sont tous calculés par rapport à la moyenne $\bar{x}$ et que celle-ci vérifie la relation $\sum (x_i - \bar{x}) = 0$.
Lors des calculs nécessaires à l'établissement de la SCE, il n'est pas conseillé de calculer chaque écart individuellement pour des raisons de risques d'erreurs d'arrondi : l'identité suivante,

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

facilite le calcul de la SCE : il suffit de calculer $\sum x_i$ et $\sum x_i^2$ à partir des données de la série puis d'appliquer la relation précédente.
L'estimation ponctuelle s^2 de la variance σ^2 est d'autant plus précise que le nombre de degrés de liberté est plus grand. Notons qu'il faut un échantillon de grande taille ($n \geq 30$) pour obtenir une estimation de précision qualifiée de « satisfaisante » en statistique.
Dans cette optique de précision d'estimation, les quantités SCE et ddl sont intéressantes à considérer car elles sont additives ; quand on dispose de deux échantillons d'effectifs n_1 et n_2 extraits de deux populations P_1 et P_2 de même variance σ^2, la



normale (notamment la symétrie de la distribution), mais il faut préciser que l'histogramme n'apporte des informations réellement efficaces que si l'effectif des données individuelles de l'échantillon est suffisamment important, un minimum de 50 valeurs est requis. Pour des échantillons de taille inférieure, il faut se contenter de supposer la normalité de la distribution de x dans la population ; une attitude prudente consiste néanmoins à vérifier qu'il n'existe pas de valeur très éloignée des autres (qualifiée par les statisticiens de valeur aberrante…), indice de la présence éventuelle d'une erreur de mesure ou de transcription.

II. Analyse des séries statistiques simples

A. Interprétation statistique dans le cas de variables quantitatives (mesures)

Dans cette partie, nous compléterons d'abord les connaissances relatives à l'estimation, puis grâce à un outil fondamental en statistique – le test d'hypothèses – nous aborderons les problèmes de comparaison des paramètres de populations (moyennes, variances) par l'intermédiaire d'échantillons.

1. Intervalle de confiance de la moyenne μ d'une population

La méthode d'estimation ponctuelle n'est pas parfaitement satisfaisante : $\bar{x}$ peut en effet être plus ou moins éloignée de la valeur vraie μ de la population en raison des fluctuations d'échantillonnage. Il est intéressant de la compléter par l'estimation d'un intervalle de confiance ou intervalle de sécurité, zone centrée sur $\bar{x}$, limitée par deux bornes [a, b] telles que μ la moyenne de la population dont est issu l'échantillon s'y trouve quasi certainement. Les quasi-certitudes adoptées sont généralement P = 0,95 ou P = 0,99. À une probabilité P correspond donc un risque $\alpha = 1 - P$, égal à 0,05 ou 0,01, que l'intervalle [a, b] ne recouvre pas cette moyenne inconnue μ de la population. Ce risque est réparti en deux parties égales (0,025 ou 0,005) de part et d'autre des bornes : il s'agit d'un risque dit bilatéral.
Le calcul de l'intervalle de confiance repose sur la loi théorique de distribution des moyennes ; pour une variable x distribuée normalement dans la population (μ, σ), les moyennes $\bar{x}$ d'échantillons d'effectif n, variables selon le hasard de l'échantillonnage, sont également distribuées suivant une loi normale de même moyenne μ mais d'écart type $\sigma_{\bar{x}}$ plus faible que σ et d'autant plus faible que n est grand :

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

La variable réduite z définie par,

$$z = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$

est distribuée suivant une loi normale de moyenne 0 et d'écart type 1, dont il existe des tables numériques établissant la correspondance entre la valeur de z et le risque α consenti. Pour $\alpha = 0,05$, z a pour valeur 1,96 (on utilise souvent 2) ; pour $\alpha = 0,01$, la valeur de z est égale à 2,58.
Du point de vue condition de validité de l'intervalle de confiance, la nécessité pour la variable x d'être distribuée normalement dans la population ne concerne que les échantillons d'effectifs $n < 30$ (le terme « petit échantillon » est classiquement employé). Pour des échantillons de grande taille ($n \geq 30$), un résultat théorique provenant de l'étude des lois de probabilité et jamais contredit par l'expérience indique que la distribution des moyennes $\bar{x}$ peut être considérée comme normale même si la distribution des valeurs individuelles x dans la population présente des écarts à la normalité : la supposition devient inutile.
Dans la pratique, il est rare de connaître l'écart type σ de la variable x dans la population : on ne peut généralement qu'utiliser son estimation s obtenue à partir de l'échantillon, à n – 1 degrés de liberté.
Alors la variable centrée réduite,

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

est distribuée selon une loi de probabilité apparentée à la loi normale, appelée loi de Student, dont il existe une table numérique établissant la correspondance entre le risque bilatéral α et la valeur de t. Elle dépend du nombre de degrés de liberté $v = n - 1$ de l'estimation de s.
La valeur de t est toujours plus grande que la valeur de z normale correspondant à un même risque α, puisque la loi de Student tient compte d'une source de fluctuation supplémentaire, l'estimation s de σ. Plus le nombre de degrés de liberté v est grand, plus la valeur de t est petite et plus elle se rapproche de la valeur de z. À titre d'illustration, pour $\alpha = 0,05$ et 9 ddl ($n = 10$) la table de Student indique $t = 2,262$, tandis que pour 29 ddl ($n = 30$) on lit pour ce même risque $t = 2,042$, très proche de $z = 1,96$.
L'intervalle de confiance de la moyenne μ de la population s'obtient par la double inégalité suivante, déduite directement de la loi de Student :

$$\bar{x} - t_v^\alpha \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t_v^\alpha \frac{s}{\sqrt{n}}$$

On l'écrit aussi, en notation abrégée,

$$\mu = \bar{x} \pm t_v^\alpha \frac{s}{\sqrt{n}}$$

où t_v^α désigne la valeur lue sur la table de Student pour le risque α et pour le nombre v de ddl.

2. Test de comparaison d'une moyenne à une valeur de référence T

Soit un échantillon d'effectif n, dans lequel la variable x étudiée a pour moyenne $\bar{x}$ et écart type s, extrait au hasard d'une population dans laquelle x est supposé distribuée normalement, les valeurs de ses paramètres μ et σ étant inconnues.

On se propose de décider, grâce aux résultats de l'échantillon, si la moyenne μ doit être considérée comme différente d'une valeur T connue à l'avance ou, au contraire, si cette valeur T peut être égale à la moyenne de la population.

La formulation statistique des deux hypothèses s'énonce ainsi : l'hypothèse nulle dite H_0 correspond à $\mu = T$ et l'hypothèse alternative, notée H_1, à $\mu \neq T$. Cette dernière hypothèse comprend deux possibilités : $\mu > T$ et $\mu < T$: le test est dit bilatéral.

La démarche utilisée, commune à tous les tests statistiques, est la suivante : on suppose l'hypothèse H_0 vraie et on évalue ses conséquences en termes de probabilité ; lorsqu'elle conduit à des conséquences jugées invraisemblables (probabilité faible, conventionnellement choisie inférieure à 0,05, parfois à 0,01), alors cette hypothèse H_0 est réfutée au profit de la contre hypothèse H_1. Le seuil de probabilité 0,05 (ou 0,01) correspond donc au risque de choisir à tort H_1 alors que H_0 est vraie. Il est appelé risque de première espèce et est noté α.

Le critère utilisé pour savoir si H_0 est invraisemblable ou non est, dans le cas de ce test, la valeur de la variable traduisant l'écart réduit entre la moyenne observée et la valeur théorique :

$$t_c = \frac{|\bar{x} - T|}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Cette variable de décision, t, suit une loi de Student à $v = n - 1$ degrés de liberté lorsque H_0 est vraie. La valeur numérique calculée est prise en valeur absolue pour être positive quelque soit le signe d'une éventuelle différence $\mu - T$.

Au risque $\alpha = 0,05$ et pour v ddl, la table de Student indique la valeur seuil $t_v^{0,05}$ permettant le choix de l'hypothèse à adopter :

- lorsque $t_c > t_v^{0,05}$, la conclusion est que l'échantillon étudié provient d'une population dont la moyenne μ est différente de T, plus petite que T si la différence observée $\bar{x} - T < 0$ et plus grande dans le cas contraire. La différence observée est dite significative (au risque $\alpha = 0,05$ choisi) ;
- lorsque $t_c < t_v^{0,05}$, il n'y a pas lieu de réfuter l'hypothèse H_0. Un tel résultat n'indique cependant pas que la moyenne μ est exactement égale à T. Il existe en effet un risque de choisir à tort H_0 alors que H_1 est vraie. Ce risque, dit de deuxième espèce et noté β, n'est pas contrôlé dans le test (contrairement au risque α) et cette probabilité β d'erreur de conclusion peut être importante, plus proche de 1 que de 0. Un test statistique n'est pas construit pour apporter la preuve d'égalités, mais la preuve « contrôlée du point de vue risque » de différences. Une expression plus nuancée sur la conclusion consiste à dire que les résultats observés sont compatibles avec l'hypothèse H_0. Cela signifie aussi que la différence inconnue $\mu - T$, si elle existe, est insuffisante, compte tenu de la variabilité de x et des moyens mis en œuvre (l'effectif n de l'échantillon), pour avoir été détectée. La formulation statistique dans ce cas est que la différence observée est non significative.

pour un risque bilatéral choisi égal à $\alpha = 0{,}05$, il faut utiliser la table correspondant au risque 0,025.
La conclusion du test repose sur la comparaison entre F_c à la valeur seuil lue sur la table :

- lorsque $F_c > F^{\text{vnum}}_{\text{vdénom}}$ *(table)*, on conclut que les variances σ_1^2 et σ_2^2 des deux populations diffèrent significativement (au risque α) ; il est possible de préciser que la population dont la variance est la plus grande est celle dont l'estimation a été placée au numérateur lors du calcul de F_c ;
- lorsque $F_c < F^{\text{vnum}}_{\text{vdénom}}$ *(table)*, les variances ne diffèrent pas significativement au risque α ; cela ne signifie pas qu'elles sont exactement égales, mais que σ_1^2 et σ_2^2 peuvent être considérées comme ayant le même ordre de grandeur.

4. Comparaison de deux moyennes observées

Une variable x est étudiée dans deux échantillons aléatoires E_1 et E_2, extraits de deux populations P_1 et P_2. On souhaite comparer les valeurs des moyennes μ_1 et μ_2 inconnues des populations grâce à l'information apportée par les deux échantillons.
L'hypothèse nulle H_0 s'écrit « $\mu_1 = \mu_2$ » tandis que l'hypothèse alternative H_1 prend la forme « $\mu_1 \neq \mu_2$ » pour un test bilatéral et « $\mu_1 < \mu_2$ » ou « $\mu_1 > \mu_2$ » en fonction des renseignements préalables dont on dispose dans le cas d'un test unilatéral.
Le choix de la démarche à utiliser, les suppositions requises pour la loi de distribution de la variable et la variance dans chaque population dépendent de la façon dont sont constitués les échantillons (échantillons indépendants ou appariés), des caractéristiques d'effectifs et de variances.

a) Échantillons indépendants, échantillons appariés

Dans de nombreuses situations expérimentales, les deux échantillons, constitués par des unités choisies au hasard dans les deux populations, sont indépendants. Cela signifie qu'il n'y a pas de raison d'associer à une donnée individuelle d'un échantillon, une donnée particulière de l'autre échantillon. Les effectifs des deux échantillons peuvent être égaux ou inégaux selon le plan choisi par l'expérimentateur.
Il arrive que cette condition ne soit pas vérifiée, chaque donnée de l'échantillon E_1 étant liée, d'une certaine manière, à une donnée homologue de l'échantillon E_2. C'est ce qui se produit lorsque les données sont obtenues à partir de la même unité expérimentale (à des périodes différentes ou selon des traitements différents). Nous sommes alors en présence d'échantillons dépendants ou appariés. Dans ce cas, les deux échantillons ont évidemment même effectif.
Pour illustrer ce concept, considérons le problème de l'étude de l'effet d'un médicament antihypertenseur sur la pression artérielle systolique (la variable mesurée) ; l'effet de ce médicament est comparé à celui d'un placebo.
Le plan expérimental peut être organisé de deux façons.
On peut constituer deux groupes aléatoires de malades, un groupe est traité par le médicament et l'autre par le placebo ; les deux séries de mesures de tension artérielle en fin de traitement constituent alors deux échantillons indépendants.
On peut aussi n'utiliser qu'un seul groupe de malades, chaque malade recevant successivement, dans un ordre tiré au sort, un traitement par ce médicament et un

traitement par le placebo. En fin de traitement, on disposera encore de deux séries de mesures, mais elles sont appariées puisque chaque unité (un malade) a fourni deux valeurs, une dans chaque série.
Il est important de noter que le test de comparaison de moyennes approprié au cas d'échantillons appariés est plus puissant (plus apte à déceler une éventuelle différence) que le test de comparaison des moyennes pour des échantillons indépendants. Il est donc incorrect d'effectuer ce dernier test lorsque les deux échantillons sont appariés.

b) Test de comparaison pour deux échantillons appariés

Les données des deux échantillons, de même effectif n, se présentent sous forme de n couples que nous notons : $x_1^1 \dots x_i^1 \dots x_n^1$ pour l'échantillon E_1 et $x_1^2 \dots x_i^2 \dots x_n^2$ pour l'échantillon E_2.
Pour chaque couple, formons la différence entre les valeurs individuelles relatives à une même unité,

$$d_i = x_i^1 - x_i^2 \text{ pour l'unité i}$$

On obtient une série de n différences $d_1 \dots d_i \dots d_n$ qu'on peut considérer comme un échantillon aléatoire de la population des différences individuelles. Cette population a une moyenne δ nulle si l'hypothèse H_0 est vraie ($\delta = \mu_1 - \mu_2$).
Le problème se ramène donc à la comparaison d'une moyenne (la moyenne des différences) à une valeur de référence égale ici à 0, problème déjà traité.
Il suffit de calculer la moyenne $\bar{d}$ des n différences observées, l'écart type s_d estimé à $v = n - 1$ ddl, puis la valeur de t_c :

$$t_c = \frac{|\bar{d} - 0|}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

Cette valeur est ensuite comparée à la valeur seuil $t_v^{0,05}$, lue dans la table de Student pour un test bilatéral avec un risque $\alpha = 0,05$ ou $t_v^{0,01}$ si le risque choisi est 0,01. Selon les valeurs respectives de ces paramètres, les moyennes des deux populations seront déclarées significativement différentes ($t_c > t_v^{\alpha}$) ou non significatives ($t_c < t_v^{\alpha}$) ainsi qu'il a déjà été dit.
Pour un test unilatéral, où *a priori* une des populations (par exemple P_1) ne peut pas avoir une moyenne plus faible que l'autre (P_2), l'hypothèse alternative sera $\mu_1 > \mu_2$; les différences individuelles sont calculées en tenant compte du sens de $H_1 : d_i = (x_i^1 - x_i^2)$. La valeur de t_c n'est pas prise en valeur absolue :

$$t_c = \frac{\bar{d} - 0}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

La valeur seuil est lue dans la table de Student, en remarquant cependant que les tables de Student sont conçues pour être directement utilisables dans le cas d'un test bilatéral : le risque α est partagé en deux (au risque 0,05 correspondent deux régions de rejet de H_0 avec un risque égal à 0,025 pour chacune). Pour un test unilatéral, le risque α est bloqué dans une des deux régions : il en résulte que pour un

risque unilatéral de 0,05 par exemple, la valeur seuil de t doit être lue pour un risque bilatéral égal à 0,10.
En ce qui concerne les conditions de validité de ce test pour séries appariées, une seule est nécessaire si le nombre n d'unités est inférieur à 30 : la distribution des différences individuelles dans la population doit être distribuée normalement. Lorsque $n \geq 30$ cette supposition n'a plus lieu d'être puisqu'on a vu que toute distribution des moyennes peut être considérée comme normale.

c) Tests de comparaison pour deux échantillons indépendants

On dispose de deux échantillons indépendants E_1 et E_2 d'effectifs n_1 et n_2, égaux ou différents, supposés représentatifs des populations P_1 et P_2 dont on ne connaît, ni les lois de distribution de la variable x, ni les paramètres moyennes et variances. L'objectif est de comparer les moyennes μ_1 et μ_2 de ces populations.
La mise en œuvre du test dépend des effectifs des échantillons.
Dans le cas de grands échantillons ($n \geq 30$), nous avons vu que la distribution des moyennes $\bar{x}$ est distribuée normalement. On peut montrer qu'il en est de même pour la différence entre les moyennes de deux grands échantillons. De plus, dans ce cas, on peut considérer que l'estimation de la variance de chaque population est satisfaisante puisque le nombre de degrés de liberté est grand. Il s'agit d'une situation intéressante pour la comparaison de deux moyennes puisque les seules conditions d'application requises pour le test sont que les échantillons soient prélevés au hasard et indépendamment dans chaque population.
En revanche, dès lors qu'un des deux échantillons au moins a un effectif petit ($n < 30$), il faut supposer que la variable x est distribuée normalement dans les deux populations afin que la distribution des moyennes $\bar{x}$ soit normale et que la distribution de la différence de deux moyennes le soit aussi. De plus, les variances inconnues des populations, dont l'une au moins est estimée de façon très imprécise, doivent être supposées égales, $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_c^2$, ce qui permet de construire une estimation s_c^2 de cette variance commune avec les données des deux échantillons, évidemment plus précise qu'avec un seul.

■ *Cas des grands échantillons : $n_1 \geq 30$ et $n_2 \geq 30$*

Les données numériques des deux échantillons permettent le calcul des moyennes et des variances estimées, $\bar{x}_1$ et s_1^2 pour l'échantillon E_1, $\bar{x}_2$ et s_2^2 pour l'échantillon E_2.
Les distributions des moyennes $\bar{x}_1$ et $\bar{x}_2$, normales, ont respectivement pour variances $\frac{s_1^2}{n_1}$ et $\frac{s_2^2}{n_2}$.
La distribution de la différence d entre ces deux moyennes, elle aussi normale, a pour variance la somme des deux variances :

$$s_d^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}$$

Cette distribution des différences a pour moyenne $\delta = \mu_1 - \mu_2 = 0$ si les deux populations ont des moyennes égales, c'est-à-dire si l'hypothèse H_0 est vraie.

Le critère utilisé pour savoir si H_0 est invraisemblable ou non est la valeur de la variable z traduisant l'écart réduit entre la différence des moyennes observées et la valeur 0 :

$$z_c = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

La variable de décision z suit une loi normale centrée réduite lorsque H_0 est vraie. La valeur z_c obtenue dans l'expérience est prise en valeur absolue dans la version bilatérale du test pour être positive quel que soit le signe de la différence $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$.
Au risque choisi, α, la version bilatérale de la table de la loi normale centrée réduite (appelée table de l'écart réduit) indique directement la valeur seuil z_α permettant le choix de l'hypothèse à adopter : pour le risque habituel $\alpha = 0{,}05$, la valeur seuil est $z_{0,05} = 1{,}96$. Pour un risque égal à 0,01, la valeur seuil devient $z_{0,01} = 2{,}58$.
Quand on utilise la table de la fonction de répartition de la loi normale, très utilisée pour le calcul des probabilités et intéressante pour la version unilatérale du test, il faut lire la valeur seuil de z pour le risque $\frac{\alpha}{2}$ afin de tenir compte du partage de ce risque dans un test bilatéral.
En ce qui concerne la conclusion du test, lorsque $z_c > z_\alpha$, la différence est significative au risque α choisi : les deux populations ont des moyennes μ_1 et μ_2 différentes. Dans le cas contraire, $z_c < z_\alpha$, la différence est dite non significative.

■ *Cas des petits échantillons : n_1 et/ou $n_2 < 30$*

Après avoir calculé les moyennes et des variances estimées, $\bar{x}_1$ et s_1^2 (à $v_1 = n_1 - 1$ ddl) pour l'échantillon E_1, $\bar{x}_2$ et s_2^2 (à $v_2 = n_2 - 1$ ddl) pour l'échantillon E_2, il convient de vérifier que la condition $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ portant sur les variances des deux populations n'est pas contredite par les données des échantillons. Il faut donc réaliser, préalablement à la comparaison des moyennes, un test F bilatéral de comparaison des variances s_1^2 et s_2^2 qui doit montrer que les variances ne diffèrent pas significativement.
Cette condition étant supposée remplie, il est ensuite procédé à l'estimation de la variance commune aux deux populations au moyen des deux séries de données

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Cette estimation de σ_c^2 est à $n_1 + n_2 - 2$ ddl.
Les distributions des moyennes $\bar{x}_1$ et $\bar{x}_2$ ont respectivement pour variances estimées $\frac{s_c^2}{n_1}$ et $\frac{s_c^2}{n_2}$.
La distribution de la différence d entre ces deux moyennes, a pour variance la somme des deux variances :

$$s_d^2 = s_c^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \text{estimation à } n_1 + n_2 - 2 \text{ ddl}$$

La loi de distribution de d est une loi de Student à $n_1 + n_2 - 2$ ddl et a pour moyenne $\delta = \mu_1 - \mu_2 = 0$ si les deux populations ont des moyennes égales, c'est-à-dire si l'hypothèse H_0 est vraie.

Le critère utilisé pour savoir si H_0 est invraisemblable ou non est dans ce cas la valeur de la variable t traduisant l'écart centré réduit entre la différence des moyennes observées et la valeur 0 :

$$t_c = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_c\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Pour un risque α bilatéral, t_c est comparé à la valeur seuil lue dans la table de Student pour $n_1 + n_2 - 2$ ddl, désignée par $t^{\alpha}_{n_1+n_2-2}$.
Lorsque $t_c > t^{\alpha}_{n_1+n_2-2}$, la différence est significative au risque α choisi : les deux populations ont des moyennes μ_1 et μ_2 différentes. Dans le cas contraire, $t_c < t^{\alpha}_{n_1+n_2-2}$, la différence est déclarée non significative.

B. Interprétation statistique dans le cas de variables qualitatives

Dans cette partie, nous préciserons la notion d'estimation d'une proportion par l'estimation d'un intervalle de confiance construit à partir des résultats d'un échantillon, puis nous effectuerons la comparaison d'une proportion observée à une proportion théorique (de référence) ; nous envisagerons enfin la comparaison de deux proportions observées.
Il est important de préciser dès maintenant que les calculs statistiques développés dans cette partie nécessitent que le ou les échantillon(s) examiné(s) vérifie(nt) certaines conditions d'effectifs, dont l'origine est l'utilisation de la loi normale en approximation de la loi réelle suivie par le paramètre étudié.
Lorsqu'on considère un échantillon d'effectif N extrait au hasard dans une population caractérisée par une proportion p_A d'unités de la catégorie A d'une variable qualitative dichotomique ou à k catégories regroupées en deux classes (A et $\bar{A}$), la fréquence f_A de A dans l'échantillon fluctue selon le hasard de l'échantillonnage ; sa loi de probabilité est une loi binomiale de moyenne p_A et d'écart type σ_A dont l'expression s'écrit :

$$\sigma_A = \sqrt{\frac{p_A(1 - p_A)}{N}}$$

Cette loi de f_A, variable discrète (variant par bond), est peu facile à utiliser dans les calculs statistiques. On peut lui substituer une loi normale (loi symétrique d'une variable quantitative continue) de même moyenne et même écart type, mais une telle approximation ne se justifie que si la distribution binomiale d'origine est très proche de la symétrie ; nous admettrons que cette condition est satisfaite dès lors que $Np_A \geq 5$ et $N(1 - p_A) \geq 5$. Il faut aussi que l'effectif N soit suffisamment grand : $N \geq 30$. En pratique p_A est toujours inconnu et il faut utiliser son estimation pour vérifier les conditions de validité de l'approximation par la loi normale.

La proportion de la variation totale de Y expliquée par la régression est caractérisée par le coefficient de détermination, noté r^2, qui s'exprime comme le rapport de la variation expliquée à la variation totale,

$$r^2 = \frac{\text{variation expliquée}}{\text{variation totale}} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Ce coefficient est un nombre sans dimension variant entre 0 et 1. Lorsque les n points sont tous exactement sur la droite, $r^2 = 1$ et la variation résiduelle est égale à zéro : la variation totale de Y s'explique parfaitement par sa relation avec X, sans erreur aléatoire. À l'opposé, quand il y a indépendance entre les variations de X et de Y, les points sont complètement éparpillés dans le graphique et la variation expliquée est nulle, $r^2 = 0$: la variation totale de Y ne contient que des fluctuations aléatoires.

Entre ces deux extrêmes, il est facile de concevoir que plus le coefficient r^2 est proche de 1, plus la fraction de la variation totale de Y expliquée par sa relation avec X est prédominante vis-à-vis des fluctuations aléatoires et plus les prédictions $\hat{y}$ pour une valeur donnée x seront précises.

Du point de vue pratique des calculs de r^2, il est intéressant d'utiliser les expressions suivantes, pour éviter les erreurs d'arrondi :

$$\text{variation totale :} \quad \sum(y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

$$\text{variation expliquée :} \quad \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 = b^2\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right]$$

Une expression équivalente de r^2, facilitant son calcul, s'écrit ainsi :

$$r^2 = b^2 \frac{n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}$$

b) Variance résiduelle

La variation résiduelle peut être calculée par différence entre la variation totale et la variation expliquée ; elle peut aussi être obtenue directement au moyen de l'expression suivante :

$$\text{variation résiduelle :} \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum y_i^2 - a\sum y_i - b\sum x_i y_i$$

Remarquons que cette variation résiduelle, traduction directe de la qualité de l'ajustement, présente l'inconvénient de dépendre du nombre n de couples de données et ne se prête donc pas facilement aux comparaisons.

La quantité,

$$s_r^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$$

appelée variance résiduelle, ne présente pas ce désavantage. s_r^2 est une estimation, construite avec les n points expérimentaux, de la variance vraie et inconnue σ_r^2

On notera que s_a, fonction de s_r, dépend aussi du nombre n de points expérimentaux, du domaine de variation de X et de l'éloignement par rapport à zéro de la moyenne $\bar{x}$ des données.
La variable aléatoire,

$$t = \frac{a - \alpha}{s_a}$$

est distribuée selon une loi de Student à n – 2 degrés de liberté, comme pour la pente, et permet les mêmes applications.

■ ***Intervalle de confiance de α***

Au risque α, l'intervalle de confiance s'écrit :

$$\alpha = a \pm t_{n-2}^{\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

■ ***Test de comparaison entre a et une valeur théorique A_0***

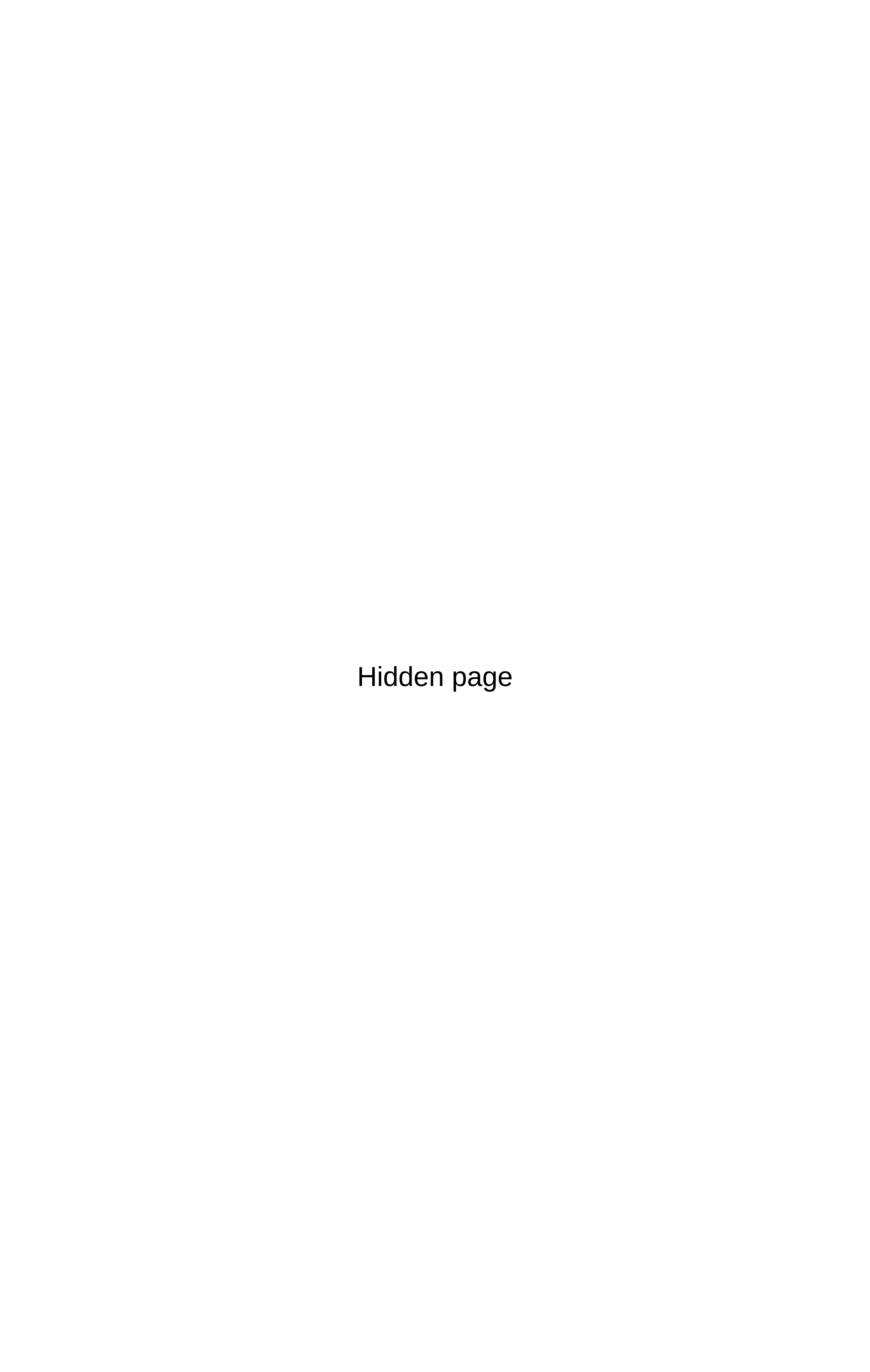
Considérons une valeur A_0 donnée à l'avance. Considérons d'autre part une régression linéaire dont l'ordonnée à l'origine a pour valeur a, estimation de la valeur inconnue α dans la population.
L'objectif est de comparer α à A_0. Les raisons d'une telle comparaison peuvent être diverses selon le type d'application ; à titre d'exemple, la comparaison de a à la valeur $A_0 = 0$ pour les résultats d'un étalonnage peut avoir pour but de vérifier que la réponse analytique prédite pour une concentration nulle en analyte ($x = 0$) ne s'écarte pas significativement de 0 (autrement dit que les résultats sont compatibles avec une droite dont l'ordonnée à l'origine est égale à 0).
Les deux hypothèses sont H_0 : « $\alpha = A_0$ » et H_1 : « $\alpha \neq A_0$ » (version bilatérale du test).
La mise en œuvre du test nécessite le calcul de la valeur t_c de la variable t traduisant l'écart réduit entre l'ordonnée à l'origine obtenue et la valeur A_0 :

$$t_c = \frac{|a - A_0|}{s_a}$$

t suit une loi de Student à n – 2 ddl.
Au risque α, le paramètre α diffère significativement de A_0 si $t_c > t_{n-2}^{\alpha}$, tandis que la différence est déclarée non significative lorsque $t_c < t_{n-2}^{\alpha}$.

B. Corrélation linéaire

Une série statistique se présente sous la forme de n couples de mesures (x_i, y_i). À la différence du cas de la régression linéaire, les variables X et Y sont toutes les deux aléatoires.
Il s'agit d'une situation expérimentale fréquente, par exemple lorsqu'il est mesuré, sur chacun d'un ensemble de sujets, deux paramètres biologiques (les valeurs des deux paramètres, variables d'un sujet à l'autre, sont aléatoires ; aucune n'est contrôlée comme nous l'avions supposé dans la régression linéaire). Mentionnons encore le cas de la comparaison de deux méthodes analytiques, chaque échantillon


Hidden page

2. Test d'indépendance entre deux variables aléatoires X et Y

Le coefficient r est calculé à partir d'un échantillon d'effectif n limité. Comme tous les paramètres déjà étudiés (moyenne $\bar{x}$, coefficient de régression b, etc.) il varie d'un échantillon à un autre. Sa valeur doit être considérée comme la réalisation d'une variable aléatoire soumise aux fluctuations d'échantillonnage autour de la vraie valeur inconnue ρ caractérisant la liaison entre les variables X et Y dans la population.

Ce nombre ρ, dont le coefficient r est une estimation ponctuelle, est défini dans la théorie des lois de probabilités pour des variables aléatoires X et Y toutes deux distribuées normalement dans la population. Les propriétés de ρ sont identiques à celles qui viennent d'être mentionnées pour r.

Dans le cas particulier où les deux lois normales, en X et en Y, sont indépendantes en probabilité ($\rho = 0$), on peut montrer que la variable aléatoire r est liée à la variable t de Student à $n - 2$ degrés de liberté par la relation :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}}\sqrt{n - 2}$$

Cette loi de Student permet de tester l'indépendance des deux variables X et Y.

Les hypothèses sont : H_0 « $\rho = 0$ » (indépendance) et H_1 « $\rho \neq 0$ » (il existe une liaison entre les deux variables).

La valeur t_c du paramètre permettant le choix entre les deux hypothèses est calculée par :

$$t_c = \left|\frac{r}{\sqrt{1 - r^2}}\sqrt{n - 2}\right|$$

où r est le coefficient de corrélation empirique de l'échantillon.

t_c est comparé à la valeur seuil t^{α}_{n-2} lue dans la table de Student (risque α bilatéral).

Lorsque $t_c > t^{\alpha}_{n-2}$, l'hypothèse H_0 d'indépendance est refusée : la liaison entre les variables aléatoires X et Y est significative.

Du point de vue conditions de validité du test, il faut supposer que les distributions des deux variables X et Y dans la population sont normales.

3. Complément sur la régression linéaire : cas où les deux variables X et Y sont aléatoires

Lorsqu'il a été montré que les deux variables aléatoires X et Y sont corrélées, il arrive fréquemment que l'on souhaite savoir dans quelle mesure la connaissance de la valeur d'une variable (X ou Y) permet de prédire la valeur de l'autre (Y ou X). Il s'agit alors d'un problème de régression.

L'application de la méthode des moindres carrés, bien adaptée au cas d'une seule variable aléatoire, conduit maintenant à considérer deux droites de régression :

- *La régression de Y en X*, dans laquelle la variable X joue le rôle de variable contrôlée et Y le rôle de variable aléatoire ; tous les écarts des points à la droite sont attribués à la seule variable Y. Son équation s'écrit $Y = \bar{y} + b_{Y/X}(X - \bar{x})$; la pente de la droite représentative de Y en fonction de X, notée $b_{Y/X}$, est obtenue à partir des données par :

$$b_{Y/X} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

Cette équation est utilisée pour prédire la valeur $\hat{y}$ pour une valeur donnée x de la variable X.

- **La régression de X en Y**, dans laquelle la variable Y joue le rôle de variable contrôlée et X le rôle de variable aléatoire ; tous les écarts des points à la droite sont attribués à la seule variable X. Son équation s'écrit $X = \bar{x} + b_{X/Y}(Y - \bar{y})$; la pente de la représentation de X en fonction de Y, notée $b_{X/Y}$, est obtenue à partir des données par :

$$b_{X/Y} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Cette équation est utilisée pour prédire la valeur $\hat{x}$ pour une valeur donnée y de la variable Y.

Pour représenter cette droite dans un système d'axes rectangulaires où Y est en ordonnées et X en abscisses, il faut réécrire son équation sous la forme :

$$Y = \bar{y} + \frac{1}{b_{X/Y}}(X - \bar{x})$$

Les deux droites de régression passent toutes deux par le centre de gravité du nuage de points ($\bar{x}$, $\bar{y}$), mais sont distinctes car les valeurs des deux pentes $b_{Y/X}$ et $\frac{1}{b_{X/Y}}$ sont différentes. Il est d'ailleurs facile de montrer que les coefficients de régression vérifient la relation :

$$b_{Y/X} \times b_{X/Y} = r^2$$

r désigne la valeur du coefficient de corrélation.

Cette relation montre que c'est seulement dans le cas extrême où r^2 est égal à 1, c'est-à-dire pour $r = \pm 1$, que les deux droites sont confondues.

Il est intéressant de noter que les valeurs du coefficient de détermination des deux régressions (Y en X et X en Y) sont identiques. On peut montrer que la valeur commune est égale au carré du coefficient r de corrélation linéaire entre X et Y, ce qui justifie la notation r^2 utilisée pour symboliser un coefficient de détermination.

En conclusion, la méthode des moindres carrés conduit à estimer deux régressions, ce qui apparaît ni très pratique, ni très satisfaisant pour établir des prédictions de la valeur d'une variable pour une valeur connue de l'autre.

Il existe d'autres méthodes pour estimer une régression en tenant compte du caractère aléatoire des deux variables ; citons par exemple la droite des moindres rectangles, la droite de régression orthogonale, méthodes qui présentent l'avantage de ne fournir qu'une seule droite de régression. Leur étude dépasse le cadre de cet article.

– *La moyenne arithmétique (paramètre de tendance centrale)*
La meilleure estimation ponctuelle de la moyenne μ d'une variable dans la population est la moyenne $\bar{x}$ de l'échantillon

$$\hat{\mu} = \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

– *La variance, l'écart type et le coefficient de variation (paramètres de dispersion)*
La meilleure estimation ponctuelle s^2 de la variance dans la population est

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}$$

L'écart type a pour expression : $s = \sqrt{s^2}$.

Le coefficient de variation est défini par : CV (%) = $100\,\frac{s}{\bar{x}}$.

II. L'estimation ponctuelle d'un paramètre est insuffisante : elle est complétée par l'estimation d'un intervalle de confiance, pour un risque α donné.
Les bornes de l'intervalle de confiance sont,

- Pour une proportion p_i

$$\left[f_i - z_\alpha\sqrt{\frac{f_i(1-f_i)}{n}}\ ;\ f_i + z_\alpha\sqrt{\frac{f_i(1-f_i)}{n}}\right]$$

sous réserve que les conditions np_i et $n(1-p_i) \geq 5$ soient satisfaites. z_α est trouvé dans la table de la loi normale pour le risque α bilatéral.

- Pour une moyenne μ

$$\left[\bar{x} - t^{\alpha}_{n-1}\frac{s}{\sqrt{n}}\ ;\ \left(\bar{x} + t^{\alpha}_{n-1}\frac{s}{\sqrt{n}}\right)\right]$$

sous réserve, lorsque $n < 30$ (petit échantillon), que la variable x soit distribuée selon une loi normale dans la population. Cette exigence n'est plus indispensable pour de grands échantillons ($n \geq 30$).
t^{α}_{n-1} est lu dans la table de Student.

Les tests de comparaison des paramètres pour des séries statistiques simples

Un test statistique est une procédure construite pour effectuer un choix entre deux hypothèses, au vu des résultats observés sur un ou plusieurs échantillons. La démarche pour la réalisation d'un test comprend :

- la formulation des hypothèses nulle H_0 et alternative H_1 (unilatérale ou bilatérale) ;
- le choix de la variable de décision qui dépend du type de problème et des données (fonction du type de la variable étudiée, de la taille et de la nature des échantillons) ;
- le choix d'un risque d'erreur α (souvent 0,05), partagé en deux pour un test bilatéral, qui conditionne la zone de rejet de l'hypothèse H_0 ;
- la conclusion du test, significatif dans le cas du rejet de H_0 et non significatif dans le cas contraire.

$$\text{pente} \rightarrow \left[b - t^{\alpha}_{n-2} \frac{s_r}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \; ; \; b + t^{\alpha}_{n-2} \frac{s_r}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \right]$$

ordonnée à l'origine →

$$\left[a - t^{\alpha}_{n-2} \times s_r \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \; ; \; a + t^{\alpha}_{n-2} \times s_r \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \right]$$

t^{α}_{n-2} est lu dans la table de Student.

- La comparaison d'une pente observée b à une pente théorique B_0 ou d'une ordonnée à l'origine a à une valeur théorique A_0 s'effectue en calculant la variable réduite,

$$t_c = \frac{|b - B_0|}{\frac{s_r}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}} \quad \text{ou} \quad t_c = \frac{|a - A_0|}{s_r \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

que l'on compare à la valeur seuil t^{α}_{n-2} lue dans la table de Student, pour le risque α bilatéral.

- Les suppositions nécessaires pour la construction des intervalles de confiance et des tests sont les suivantes : linéarité de la fonction $Y = f(X)$, normalité de la distribution de la variable aléatoire Y et homogénéité des variances de Y pour toutes les valeurs de la variable contrôlée X (homoscédasticité).

3. **Le coefficient de corrélation linéaire r** entre deux variables aléatoires X et Y distribuées normalement traduit l'intensité de la liaison entre ces variables. À partir des n couples de données d'un échantillon, il est calculé par l'expression,

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \times \sum (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right)\left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}}.$$

Il s'agit d'un nombre sans dimension compris entre – 1 et + 1.

- Le test d'indépendance linéaire entre les deux variables X et Y est réalisé en formant la variable réduite

$$t_c = \left| \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2} \right|$$

que l'on compare à la valeur seuil t^{α}_{n-2} lue dans la table de Student, pour le risque α bilatéral.

- Le caractère aléatoire des deux variables implique l'existence de deux régressions distinctes par la méthode des moindres carrés ; la régression de Y en X ($Y = \bar{y} + b_{Y/X}X$) qui permet de prédire la valeur $\hat{y}$ pour une valeur donnée x et la régression de X en Y ($X = \bar{x} + b_{X/Y}Y$) permettant, elle, de prédire la valeur $\hat{x}$ pour une valeur donnée y. Les deux coefficients de régression sont liés par l'expression $b_{Y/X} \times b_{X/Y} = r^2$.


Hidden page

Toxicologie
Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques

Retrouvez dans ce tome 1 les disciplines suivantes :

- la toxicologie générale,
- la toxicologie clinique,
- la toxicologie professionnelle,
- la santé publique et la législation,
- la biophysique, la chimie organique et analytique,
- les statistiques.

La collection du Moniteur Internat est devenue un outil de référence pour les pharmaciens et les biologistes, ainsi qu'une base de travail indispensable aux étudiants qui préparent le concours de l'Internat en pharmacie.
Rédigés par une équipe d'auteurs dirigée par Michel Vaubourdolle, biologiste à l'hôpital Saint-Antoine à Paris, les quatre tomes de la collection comportent les connaissances essentielles des disciplines pharmaceutiques et biologiques.

ISBN : 978-2-915585-38-4



www.WK-Pharma.fr

